

DULCINÉIA MARTINS DE ALBUQUERQUE

**ASPECTOS MOLECULARES DO CITOMEGALOVÍRUS
HUMANO DURANTE INFECÇÃO ATIVA EM PACIENTES
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**

CAMPINAS

2006

DULCINÉIA MARTINS DE ALBUQUERQUE

**ASPECTOS MOLECULARES DO CITOMEGALOVÍRUS
HUMANO DURANTE INFECÇÃO ATIVA EM PACIENTES
SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas
para a obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área
de concentração em Ciências Básicas*

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Al 15a Albuquerque, Dulcinéia Martins de
Aspectos moleculares do citomegalovírus humano durante infecção
ativa em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea /
Dulcinéia Martins de Albuquerque. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus 2. Genotipagem. 3. Medula Óssea -
Transplante. 4. Biologia Molecular. 5. Infecção. I. Costa, Sandra
Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : “Molecular profile of human cytomegalovirus in bone marrow transplant recipients with active infection”

Keywords: • Cytomegalovirus

- Genotyping
- Bone Marrow Transplantation
- Molecular Biology
- Infection

Área de concentração : Ciências Básicas

Titulação: Doutorado em Clínica Médica

Banca examinadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
Profa. Dra. Andréa Mendonça Gusmão Cunha
Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo
Profa. Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçales
Profa. Dra. Maria de Lourdes Barjas Castro

Data da defesa: 24-02-2006

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Mônica Barbosa de Melo Mônica Barbosa de Melo
2. Prof(a). Dr(a). Andréa Mendonça Gusmão Cunha Andréa Mendonça Gusmão Cunha
3. Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Rios Barjas Castro Maria de Lourdes Rios Barjas Castro
4. Prof(a). Dr(a). Neiva Sellan Lopes Gonçalves Neiva Sellan Lopes Gonçalves
5. Prof(a). Dr(a). Sandra Cecília Botelho Costa Sandra Cecília Botelho Costa

**Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas,
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 24/02/2006

Aos meus pais Eugênio e Amália, que com muito sacrifício, compreensão, incentivo, paciência e acima de tudo do grande amor, proporcionaram a concretização de mais esse sonho...

Aos meus irmãos Marcos, Andréa e Luciana, pela dedicação, carinho, força e companheirismo...

Aos meus tios e primos pelo apoio...

*Á Prof^a Dr^a Sandra Cecília Botelho Costa
principalmente pela confiança incondicional,
compreensão...enfim, pelo apoio necessário para a
conclusão deste trabalho..e ao Prof Dr. Fernando
Ferreira Costa pelo grande incentivo e
oportunidades....*

A Deus, dedico e ofereço este trabalho como forma de agradecimento por Ele fazer parte da minha vida e por ter colocado em meu caminho amigos nos quais encontrei apoio e incentivo para poder prosseguir...

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto...”

(Albert Einstein)

	PÁG.
RESUMO	xxxv
ABSTRACT	xxxix
1- INTRODUÇÃO	43
1.1- Histórico	45
1.2- Características Biológicas do Citomegalovírus Humano	46
1.3- Mecanismo de Replicação e Regulação Gênica do HCMV	49
1.4- Epidemiologia e Transmissão	51
1.5- Patogênese e Manifestações Clínicas	52
1.6- Infecção por CMV em Pacientes Transplantados	53
1.7- Diagnóstico Laboratorial	54
1.8- Linhagens de Citomegalovírus Humano	57
1.8.1- Glicoproteína B (UL 55).....	58
1.9- Determinação da Carga Viral	59
1.10- Resistência ao Agente Antiviral	62
2- OBJETIVOS	67
3- CASUÍSTICA	71
4- MÉTODOS	75
4.1- Extração do DNA	77
4.2- Amplificação Gênica (PCR) para o HCMV	78
4.3- Amplificação Gênica (PCR) para β-Globina Humana	80
4.4- Normas Aplicadas para se Evitar Contaminação	81

4.5- Identificação das Linhagens de HCMV.....	82
4.6- PCR Quantitativo em Tempo Real.....	84
4.7- Resistência a Agentes Antivirais.....	87
5- RESULTADOS.....	91
5.1- “Nested-PCR” para Amplificação da gB.....	93
5.2- Quantificação da Carga Viral – PCR em Tempo Real.....	99
5.3- Resistência a Agentes Antivirais.....	105
6- DISCUSSÃO.....	115
7- CONCLUSÕES.....	125
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
9-ANEXO.....	147

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	Microlitros
AA	Anemia Aplástica
AD169	Linhagem de HCMV isolada em laboratório
AIDS	“Acquired Immune Deficiency Syndrome” – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CNS	“Central Nervous System” - Sistema nervoso central
CPP	Células Progenitoras Periféricas
CSF	“Cerebro Spinal Fluid” - Fluido cerebrospinal
dH₂O	Água destilada, deionizada e estéril
DNA	“Desoxiribonucleic Acid” - Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifostato
E	“Early” - Período precoce da expressão gênica
EDTA	“Ethylene Diamine Tetraacetic Acid” - Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” – teste sorológico imunoenzimático
Fab	Porção da molécula da imunoglobulina
FC	“Fixation of Complement” - Reação de Fixação de Complemento
Fc	Porção da molécula da imunoglobulina
g	Força gravitacional
gB e gH	Glicoproteínas B e H do envelope do HCMV
GVHD	“Graft Versus Host Disease” - Doença de enxerto contra o hospedeiro
HCMV	“Human Cytomegalovirus” - Citomegalovírus Humano
HHV-5	“Human Herpes Virus – 5” - Herpes Vírus Humano tipo 5

HIV	“Human Immune Deficiency Virus” - Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	“Herpes Simplex Virus” – Vírus da <i>Herpes simplex</i>
IE	“Immediate Early” - Período imediatamente precoce da expressão gênica
IFI	“Indirect Immunofluorescence assay” – Ensaio de Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IR_L / IR_S	“Inverted Repeats” - seqüências invertidas repetidas do genoma do HCMV
Kb	Kilobases
Kpb	Kilo pares de bases
L	“Late” - Período tardio da expressão gênica
LA	“Late Antigen” - Região gênica
L-DNA	LeucoDNAemia
LH	Linfoma de Hodking
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LNH	Linfoma Não-Hodking
M	Molar
mA	Miliampere
Mab	“Monoclonal antibody” - Anticorpo Monoclonal
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MM	Mieloma Múltiplo

MO	Medula Óssea
mRNA	“Messenger RNA” - RNA mensageiro
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
nPCR	“Nested-PCR”
pb	Pares de bases
PBL	“Peripheral Blood Leucocytes” - Leucócitos do sangue periférico
PCR	“Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase
P-DNA	PlasmaDNAemia
pg	Picogramas
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomoles
pp65	Proteína matricial de peso molecular 65 kD
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” – Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
RIA	“Radioimmunoassay” - Radioimunoensaio
RNA	“Ribonucleic Acid” - Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SDS	“Sodium Dodecyl Sulphate” - Duodecil sulfato de sódio
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SSCP	“Single Strand Conformation Polymorphism” – Polimorfismo de conformação de fita simples
TKM1/ TKM2	“Tris, KCl and MgCl ₂ buffer” - Tampões de lise celular

TMO	Transplante de Medula Óssea
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TR_L / TR_S	“Terminal Repeats” - seqüências de terminações repetidas do genoma do HCMV
U	Unidades
U_L	“Unique Long” - seqüência única longa do genoma do HCMV
U_S	“Unique Short” - seqüência única curta do genoma do HCMV
V	Volts
V/h	Volts por hora
W	Watt

LISTA DE TABELAS

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Pacientes Incluídos no Estudo.....	74
Tabela 2- Seqüência dos “Primers” Utilizados para a Detecção do HCMV.....	79
Tabela 3- Seqüência dos “Primers” para Amplificação do Gene da β -globina Humana.....	80
Tabela 4- Seqüência dos “Primers” para a Amplificação da região gB do HCMV.....	82
Tabela 5- Seqüência dos “Primers” e Sonda para a RT-PCR.....	86
Tabela 6- Seqüência dos “Primers” para a Detecção de Mutações no Gene UL97.....	87
Tabela 7- Seqüência dos “Primers” para a Detecção de Mutações no Gene UL54.....	88
Tabela 8- Principais Manifestações Clínicas Observadas.....	97
Tabela 9- Polimorfismos e Mutações nos Genes UL97 e UL54.....	106
Tabela 10- Polimorfismos para o Gene UL97.....	110
Tabela 11- Polimorfismos para o Gene UL54.....	113

	PÁG.
Figura 1- Estrutura do Citomegalovírus Humano (HCMV).....	47
Figura 2- Organização Genômica do HCMV.....	48
Figura 3- Mecanismo de Replicação do HCMV.....	51
Figura 4- Amplificação da Região da Glicoproteína B do HCMV.....	93
Figura 5- Padrões de Digestão (gB) Encontrados para as Amostras Analisadas.....	94
Figura 6- RT-PCR: (A) Curva de Amplificação; (B) Curva Padrão – Eficiência.....	101
Figura 7- Gráficos representando o seguimento dos pacientes e metodologias aplicadas.....	104
Figura 8- Amplificação da Região do Gene UL97 do HCMV.....	105
Figura 9- Seqüenciamento do Gene UL97.....	107
Figura 10- Seqüenciamento do Gene UL97.....	108
Figura 11- Seqüenciamento do Gene UL97.....	109
Figura 12- Amplificação da Região do Gene UL54 do HCMV.....	111
Figura 13- Seqüenciamento do Gene UL54.....	112

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>PÁG.</i>
Gráfico 1- Frequência dos Genótipos gB – Amostras HCMV Positivas.....	95
Gráfico 2- Frequência dos Genótipos gB – Entre Pacientes.....	96
Gráfico 3- Associação Genótipo gB versus Apresentação Clínica.....	98
Gráfico 4- Comparação entre RT-PCR, nPCR sangue e nPCR soro – amostras diagnosticadas.....	99
Gráfico 5- Comparação entre RT-PCR, nPCR sangue e nPCR soro – total das amostras.....	100

LISTA DE QUADROS

	<i>PÁG.</i>
Quadro 1- Padrão de Digestão para gB de HCMV Utilizando-se as Enzimas Rsa I e Hinf I.....	84

RESUMO

O Citomegalovírus Humano (HCMV) continua sendo uma causa significativa de morbidade em pacientes imunocomprometidos, especialmente em transplantados de medula óssea, e pode manifestar diversas complicações que incluem hepatite, doença gastrointestinal e pneumonia intersticial ou a denominada “Síndrome Viral por HCMV” caracterizada por febre, leucopenia e trombocitopenia. O HCMV pode também ter um efeito imuno-modulador, fazendo da infecção por esse vírus um fator de risco importante para o desenvolvimento de rejeição ao enxerto aguda e crônica e para co-infecção com outras herpesvírus. A detecção do genoma do HCMV pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) é específica e sensível, e pode ser usada como uma poderosa ferramenta para o diagnóstico precoce da infecção causada por este vírus. Variações em regiões funcionalmente relevantes do genoma do HCMV têm sido utilizadas como marcadores genéticos em diversos estudos clínicos para diferenciar as linhagens do vírus e associá-las com a patogênese viral e com as manifestações clínicas no paciente. A glicoproteína B (gB) é a maior glicoproteína do envelope do HCMV e tem sido relacionada à entrada na célula hospedeira, transmissão célula-a-célula, e conseqüentemente à fusão das células infectadas. A amplificação do gene gB pela PCR combinada com análise de restrição por RFLP em regiões polimórficas deste gene são eficientes para a identificação dos genótipos do HCMV, tornando possível a distinção de pelo menos 4 padrões eletroforéticos. Por outro lado, a determinação da carga viral em pacientes imunologicamente afetados tem sido associada como marcador ou preditor do desenvolvimento de doença por HCMV órgão-específica. Sendo assim, a determinação da carga viral, especificamente nestes pacientes, é fundamental para a supervisão da terapia antiviral. Além disso, os valores da carga viral estão relacionados aos níveis de imunossupressão, à patogênese do HCMV e ao grupo de pacientes e/ou ao tipo de transplante e podem indicar o início da administração da terapia antiviral. O método de real-time PCR (RT-PCR) foi aplicado para a quantificação do genoma do HCMV em amostras clínicas e a detecção e posterior quantificação do DNA do HCMV em amostras de soro por esta técnica é capaz de distinguir entre pacientes com infecções sintomáticas daqueles com infecções inativas ou latente. Avanços têm sido feitos na prevenção da doença por HCMV após o transplante de medula óssea, inclusive a administração profilática, por períodos prolongados, de antivirais como o Acyclovir e o Ganciclovir e como conseqüência, pode originar linhagens resistentes relacionadas principalmente a dois genes virais: a fosfotransferase viral (UL97) e a DNA polimerase

viral (UL54). Sabendo-se da importância da identificação das linhagens do HCMV em pacientes transplantados de medula óssea e da possível relação com a infecção e apresentação clínica; da relevância em determinar a carga viral como preditor de doença; e finalmente, da detecção de linhagens resistentes aos agentes antivirais disponíveis, este estudo avaliou, prospectivamente, pacientes transplantados de medula óssea em seguimento no Hemocentro/UNICAMP. Além disso, teve como principais objetivos: determinar a prevalência dos genótipos do HCMV e avaliar uma possível associação com a apresentação clínica nesses pacientes; determinar a carga viral para o monitoramento da terapia antiviral; e identificar e correlacionar mutações que conferem resistência ao Ganciclovir com carga viral e apresentação clínica. Foram incluídas na casuística, 169 amostras de DNA de sangue periférico e 187 amostras de DNA de soro de 22 pacientes transplantados de medula óssea. Dentre as 47 amostras de DNA de sangue periférico HCMV positivas, 42 foram genotipadas e observamos a prevalência do genótipo gB1 (47%) como descrito em literatura, e embora sem comprovação estatística, notamos a tendência deste genótipo com melhor prognóstico. Aplicamos a RT-PCR em 96 amostras de DNA de soro de 12 pacientes transplantados de medula óssea seguidos no Ambulatório de Hematologia, e observamos que o método é adequado para a avaliação da carga viral neste grupo de pacientes. No entanto, é necessário estabelecer um valor de corte a fim de se utilizar esta metodologia para obtenção de um valor que seja preditivo de doença e para o monitoramento do tratamento dos pacientes. Este método mostrou-se mais preciso que a “nested”-PCR no mesmo tipo de amostra. Além disso, identificamos 8 novas mutações no gene UL97, uma delas pode estar relacionada à resistência viral ao Ganciclovir. Dentre os polimorfismos identificados, 3 parecem estar relacionados ao genótipo gB1 e possivelmente podem ser utilizadas como marcadores genéticos para a genotipagem do HCMV. Para o gene UL54 foram identificadas 5 novas mutações na região IV do gene e que geralmente é relacionada à resistência ao Ganciclovir. Nós concluímos que a determinação da carga viral é importante, mas não é o único modo de avaliar a eficiência do tratamento antiviral. Dessa forma, a avaliação de outros parâmetros moleculares, como a genotipagem e mutações relacionadas à resistência aos antivirais, são informações complementares e devem ser consideradas para o monitoramento da evolução clínica em pacientes transplantados de medula óssea.

ABSTRACT

Human Cytomegalovirus (HCMV) remains a significant cause of morbidity in immunocompromised patients, especially in bone marrow transplant recipients. It may manifest severe complications including hepatitis, gastrointestinal disease, and interstitial pneumonitis or as so-called “HCMV viral syndrome” with fever, leukopenia, and thrombocytopenia. The HCMV may also has an immunomodulatory effect, potentially making HCMV infection an important risk factor for the development of an acute and chronic allograft rejection and for coinfection with other herpesviruses. The detection of the HCMV genome by PCR (Polymerase Chain Reaction) is specific and sensitive. Besides this, it can be used as a powerful tool for the early diagnoses of the infection caused by this virus. Variations in functionally relevant areas of the HCMV genome have been used as genetic markers in numerous clinical studies to differentiate the HCMV strains and to associate them with the viral pathogenesis further with the patients’ clinical manifestations. The glycoprotein B (gB) is the major glycoprotein of HCMV’s envelope and it has been implicated in host cell entry, cell-to-cell virus transmission, consequently in the fusion of infected cells. The gB amplification by PCR combined with the restriction analysis by RFLP in polymorphic areas are effective for the identification of the HCMV genotypes, becoming possible the distinction of at least 4 electrophoretic patterns. On the other hand, the determination of the viral load in the immunologically affected patients has been associated as marker or predictor for the development of the organ specific disease by the HCMV. Hence, the determination of the viral load in these specific patients is fundamental for the management of the antiviral therapy. In addition, the viral load values are related to levels of the immune-suppression, the pathogenesis of the HCMV and the group of patients and/or the type of transplant. Furthermore, the viral load values can indicate the beginning of the antiviral therapy administration. A real-time PCR (RT-PCR) assay was applied for quantifying the HCMV genome load in clinical samples and the detection and quantification of HCMV DNA in blood serum through RT-PCR are able to distinguish patients with symptomatic infections among those with latent or inactive infections. Advances have been made in the prevention of HCMV disease after bone marrow transplantation, including prophylactic administration of antivirals such as Acyclovir and Ganciclovir. The HCMV prophylaxis with antiviral in this patients’ group is administered for prolonged periods of therapy, consequently it can originate resistant viruses related

mainly to two genes: the viral phosphotransferase (UL97) and the viral DNA polymerase (UL54). Ahead the importance of the identification of HCMV strains in bone marrow transplant patients, the HCMV strains performance in the patients' infection and clinical presentation, the relevance of determinating the viral load as a disease predictor, and finally, the detection of the resistant strains to the available antivirals, this study prospectively evaluated bone marrow transplant recipients followed at Hemocentro/UNICAMP. Moreover, it had as main goals: to determine the prevalence of the HCMV gB genotypes, to evaluate a possible gB genotype association with the patients' clinical presentation; to determinate the viral load for monitoring the antiviral therapy, and to correlate Ganciclovir resistant mutations in UL97 and UL54 gene with the viral load and patients' clinical presentation. From 22 bone marrow transplant recipients, DNA samples of peripheral blood (169) and DNA samples of blood serum (187) were included in this casuistic. Among 47 HCMV positive samples, 42 were genotyped. We observed the prevalence of gB1 genotype (47%), as described in the specific literature, however without statistical analysis, the raw data exhibited that gB1 genotype can be related to patients' better prognostics. From 12 followed bone marrow transplant recipients, we applied the RT-PCR in 96 DNA blood serum samples and we observed that the method was accurate for the viral load evaluation in this patients' group. However, it is necessary to establish a crucial cutoff to consider whether a specific value of viral load is a predictive value to cause HCMV disease and to monitor the patients' treatment. This method was more precise than the nested-PCR for blood serum samples. Additionally, we identified 8 new mutations in UL97 gene, one of them can be related to Ganciclovir HCMV resistance. Among all of identified polymorphisms, 3 of them can be related to gB1 genotype and may be used as genetic marker to HCMV genotyping. In the region IV of the UL54 gene, 5 new mutations were identified, and can possibly be related to Ganciclovir HCMV resistance. We concluded that the determination of the patients' viral load is crucial, even so it is not the only way to evaluate the antiviral treatment efficacy. Then, the evaluation of other molecular parameters as genotyping and mutations related to the HCMV antiviral resistance, are complementary information and must be considered to monitor the clinical evolution of bone marrow transplant recipients.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

O Citomegalovírus humano (HCMV), identificado em 1904 por Ribbert, é o agente etiológico da “doença de inclusão citomegálica” e cuja denominação deriva-se do efeito citopático característico representado pelo aumento do volume celular por inclusões intranuclear e citoplasmática, no tecido infectado, (MURRAY, 1997; MAYA & AZULAY, 2000). Células com características semelhantes têm sido descritas desde 1881 e em 1921, Goodpasture e Talbot relataram um caso fatal associado a esse vírus envolvendo pulmão, fígado e rim de uma criança recém-nascida (DREW, 1988b). Inclusões pequenas, mas similares àquelas encontradas foram observadas por Tyzzer em biópsia de lesão de pele causada por varicela e Lipschutz foi quem primeiro reconheceu esta similaridade e postulou uma etiologia viral para a “Doença de Inclusão Citomegálica” (ALFORD & BRITT, 1990).

Cole e Kuttner, em 1926, puderam demonstrar que o vírus estava presente em glândulas submaxilares de cobaia e que a sua presença estava associada com células que continham corpúsculos de inclusão. O primeiro estudo sistemático sobre prevalência desta infecção em crianças foi realizado por Farber e Wolbach em 1932, encontrando células citomegálicas típicas nas glândulas salivares de 14% das crianças analisadas (PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996). Fetterman, em 1952, diagnosticou “Doença de Inclusão Citomegálica” por exame citológico de urina e Minder (1953), utilizando a microscopia eletrônica, identificou a partícula viral (DREW, 1988b; MAYA & AZULAY, 2000). Margaret Smith conseguiu, em 1954, isolar o vírus em cultura de tecido, usando a infecção de glândula salivar de cobaia como modelo (COSTA, 1999).

Através das técnicas de cultura celular, o HCMV foi independentemente isolado por três laboratórios distintos, em amostras de urina e tecido de crianças com manifestações clínicas de provável infecção pelo vírus (PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996; DREW, 1988a; COSTA, 1999). Smith conseguiu isolar o vírus das glândulas salivares de 2 crianças - uma morreu de infecção citomegálica generalizada; no mesmo ano, Rowe e colaboradores isolaram três linhagens de HCMV de tecido adenoidal de crianças submetidas a adenoidectomia e a partir destes estudos, conseguiram adaptar uma linhagem de HCMV em laboratório (AD169), replicando em culturas de fibroblastos humanos. Weller e colaboradores reconheceram o vírus em amostras de urina e pulmão de crianças

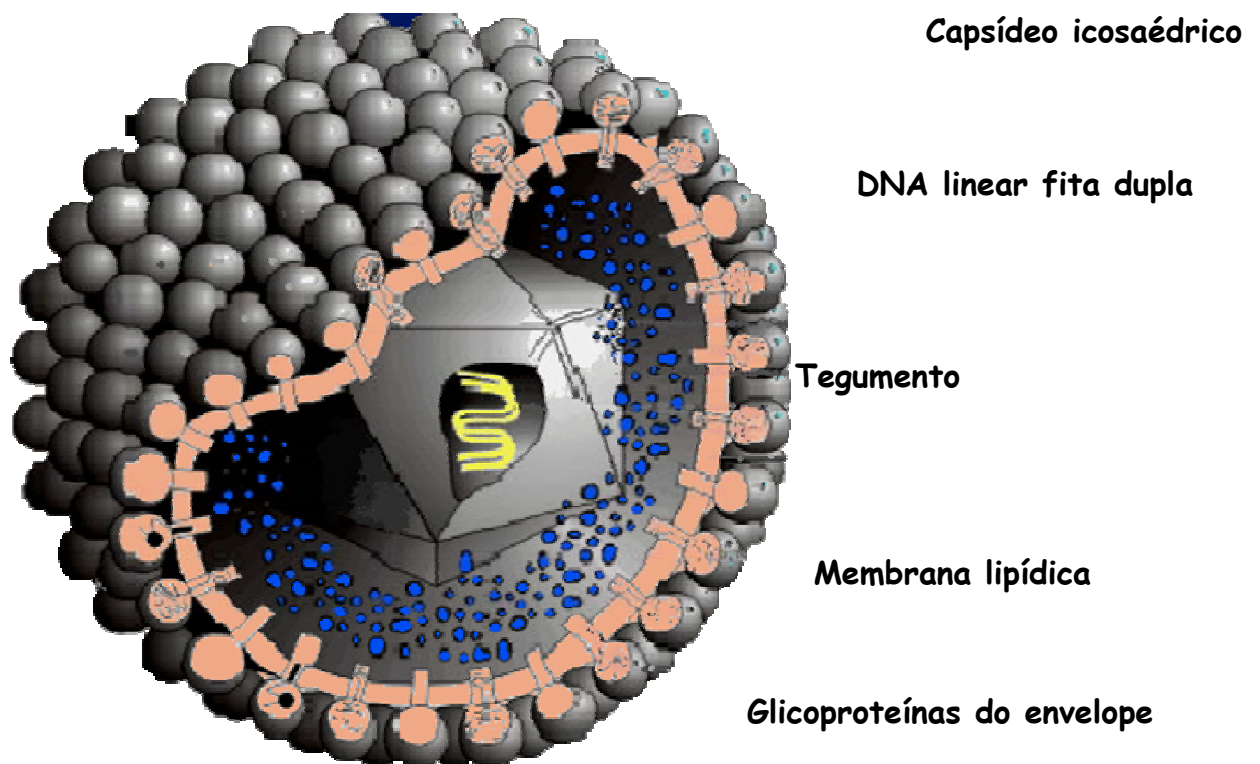
com doença de inclusão citomegálica generalizada. Em cada laboratório foi detectado um efeito citopático idêntico (ALFORD & BRITT, 1990).

A partir de 1960, com a evolução nos processos cirúrgicos para transplantes, a infecção pelo HCMV começa a ser reconhecida como uma patologia de importância clínica, sendo considerado o principal agente patogênico em hospedeiros com o sistema imunológico comprometido. Na década seguinte, foram organizados grupos de estudo para avaliar o impacto da infecção nos pacientes imunocomprometidos e propor medidas para manter a infecção sob controle. Foi iniciada, em 1980, a utilização de medidas para o controle do vírus com agentes antivirais e intervenções imunológicas, e atualmente, os avanços para a compreensão dessa virose estão relacionados aos aspectos moleculares da infecção e controle clínico, principalmente nos grupos de risco (RUBIN, 1990; COSTA, 1999).

1.2- Características Biológicas do Citomegalovírus Humano

O HCMV pertence à família *Herpesviridae*, sub-família *Betaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus*. É considerado o maior membro da família e possui ultra-estrutura semelhante à de outros Herpes vírus, comprovada por microscopia eletrônica, por isso é também conhecido como Herpes Vírus Humano tipo 5 (HHV-5) (MOCARSKI *et al.*, 1990; BROWN & ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999). Essa classificação é baseada nas propriedades biológicas de especificidade ao hospedeiro, ciclo de replicação e efeitos citopáticos e em geral, os CMVs são vírus espécie-específicos para replicação e patogênese (STINSKI, 1990). Têm sido isolados de muitos vertebrados diferentes - entre eles: camundongos, porquinhos-da-índia, macacos, inclusive o homem (MUSTAFA, 1994; ALFORD & BRITT, 1990).

A partícula viral consiste de um capsídeo icosaédrico de 110 nm de diâmetro composto por 162 capsômeros, no interior do qual se encontra o núcleo de 64 nm de diâmetro contendo o material genético (DNA). O vírion completo é cercado por um envelope glicolipídico e tem um diâmetro final de 200nm (MUSTAFA, 1994; COSTA, 1999) (*Figura 1*).



Adaptado de BIOGRAFIX - '97 Marko Reschke

Figure 1- Estrutura Morfológica do HCMV (www.biografix.de/hcmv/metaframe/htm)

O genoma do HCMV é constituído por uma cadeia dupla de DNA linear, com aproximadamente 240 Kpb (COSTA, 1999). Quando desnaturadas, as fitas de DNA do HCMV tendem a se anelar e formar “loop”, indicativo de que as moléculas possuem dois pares de repetições invertidas que subdividem o genoma em um segmento grande, correspondente a uma única região (U_L, 174 Kpb) que está inserida entre repetições invertidas (IR_L / TR_L) e um segmento pequeno (U_S), que é uma sequência única de 35,6 Kpb flanqueada por repetições curtas invertidas (IR_S / TR_S) (**Figura 2**) (RÜGER, BORNKAMM & FLECKENSTEIN, 1984; SPECTOR *et al.*, 1990).

Recentemente, foi observado que o RNA era purificado a partir das partículas virais. Este mecanismo da expressão gênica dos herpesvírus permite que os genes virais sejam expressos no interior da célula infectada imediatamente após a entrada viral e na ausência de transcrição do genoma viral. Não se sabe ainda a função das proteínas codificadas por esse RNA (BRESNAHAN & SHENK, 2000).

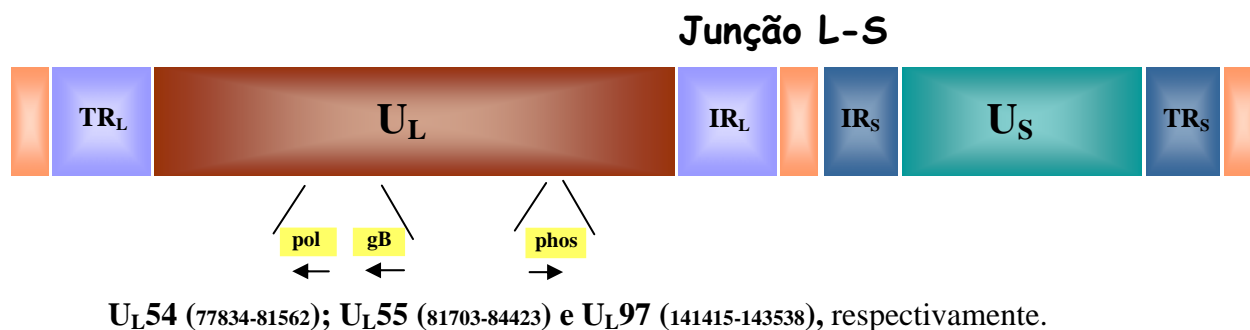


Figure 2- Organização genômica do HCMV.

U _L – “Unique Long region” U _S – “Unique Short region” TR _L – “Terminal Repeated Long” IR _L – “Internal Repeated Long”	TR _S – “Terminal Repeated Short” IR _S – “Internal Repeated Short” gB – gene da Glicoproteína B Pol – gene da Polimerase Phos – gene da fosfotransferase
---	---

Durante a infecção produtiva, o genoma do HCMV é expresso em períodos coordenados e é regulado por uma cascata de eventos transcricionais que levam à síntese de três categorias de proteínas virais denominadas: “immediate-early” (IE ou α), “early” (E ou β), e “late” (L ou γ). As proteínas que são sintetizadas durante os períodos IE (0 a 2 horas pós-infecção) e E (2 a 24 horas pós-infecção) são regulatórias, com função enzimática e essenciais na replicação viral, enquanto as sintetizadas no período L (24 horas pós-infecção) são relacionadas à elementos estruturais (RASMUSSEN, 1990).

As proteínas IE têm um impacto profundo sobre a fisiologia da célula hospedeira, pois regulam a expressão de um grande número de genes desta célula. A expressão dos genes E depende da presença de proteínas IE funcionais e não é afetada por inibidores da replicação do DNA viral, a maioria delas codifica proteínas não estruturais, inclusive fatores de replicação do DNA viral, enzimas de reparo e proteínas envolvidas na evasão imune. As proteínas L são a última classe de produtos gênicos expressos durante a replicação do HCMV e elas têm principalmente papel estrutural e contribuem para a adsorção e morfogênese do vírion (LANDOLFO *et al.*, 2003).

O HCMV é um vírus extremamente lábil a 37°C, é inativado a 56°C durante 30 minutos, pH baixo (<5), exposição ao éter 20% por 2 horas, luz ultravioleta por 5 minutos e ciclos de congelamento e descongelamento; é mais estável na urina a 4°C (DREW, 1988; BROWN & ABERNATHY, 1998; COSTA, 1999).

1.3- Mecanismo de Replicação e Regulação Gênica do HCMV

Apesar do tamanho, complexidade do genoma e capacidade em expressar muitos genes, os betaherpesvírus mostram uma forte associação e dependência pelas células hospedeiras. No hospedeiro natural, algumas células são mais susceptíveis à infecção que outras (STINSKI, 1990). Os mecanismos moleculares que determinam a permissividade das células para a replicação do HCMV não são entendidos, mas sabe-se que o vírus pode penetrar em uma variedade de células humanas e não-humanas sem que ocorra a replicação. Durante a infecção natural, a replicação viral pode ocorrer em células epiteliais, endoteliais,

musculares, mesenquimais, hepatócitos, granulócitos e macrófagos. Conclui-se, desse modo, que fatores celulares determinam as consequências da infecção pelo HCMV após a entrada viral (MOCARSKI, *et al.*, 1990; PLACHTER, SINZGER & JAHN, 1996).

A replicação do HCMV em cultura celular e após infectar o hospedeiro é lenta, e o período de possível doença pelo vírus é prolongado, podendo permanecer em estado latente. Para iniciar a infecção, é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores de superfície celular, resultado de uma cascata de interações entre proteínas virais e celulares, seguido da fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. Esse processo é rápido e eficiente tanto nos tipos celulares permissivos quanto nos não-permissivos. A partir daí, o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA é liberado no núcleo celular, onde ocorre a transcrição, replicação do DNA viral e produção de novos capsídeos (SILVA, 2000; LANDOLFO *et al.*, 2003) (**Figura 3**).

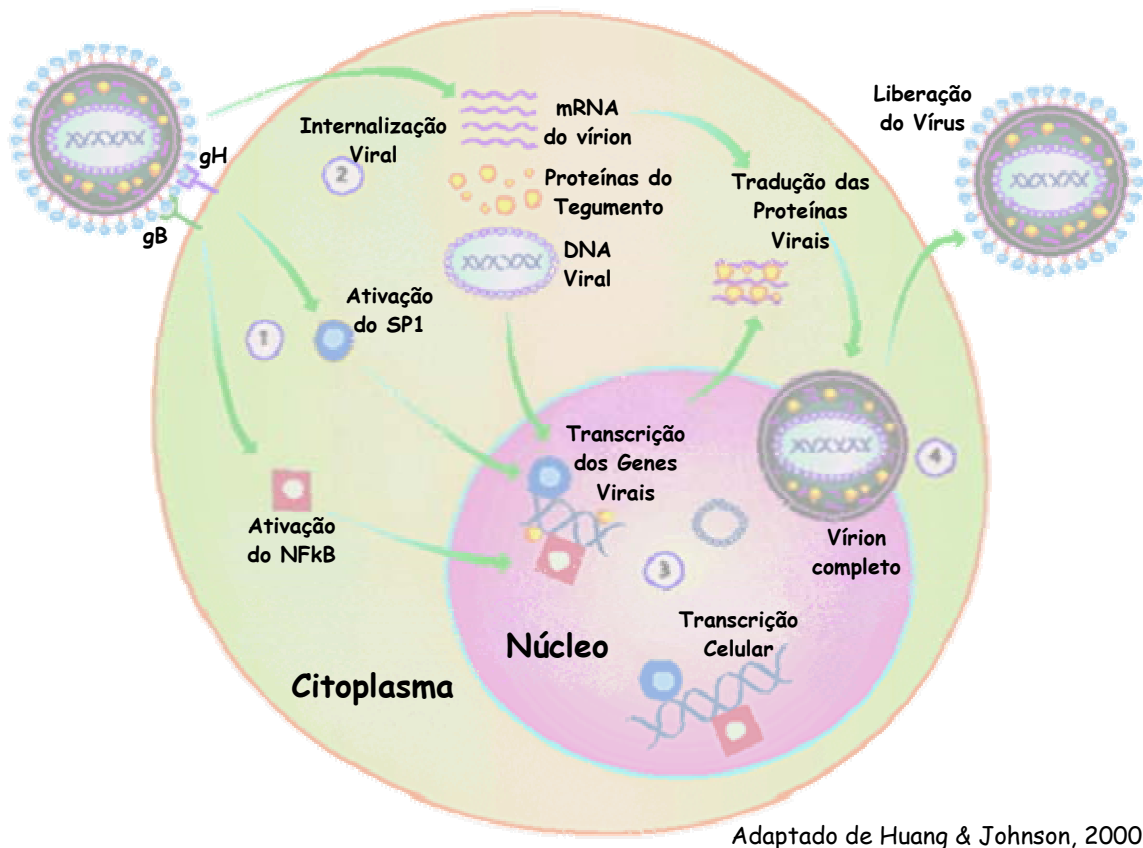


Figura 3- Mecanismo de replicação do HCMV.

1.4- Epidemiologia e Transmissão

Um dos mais intrigantes aspectos da biologia do HCMV é a distribuição altamente eficiente do vírus em toda a população, enquanto a associação com sintomas graves causados pela infecção é um evento relativamente raro.

Acredita-se que os seres humanos sejam os únicos reservatórios para o HCMV, e a transmissão ocorre por contato direto ou indireto entre pessoas. A transmissão do vírus se dá por contato próximo e/ou íntimo e inclui: secreções orofaríngeas, urina, excreções cêrvica e vaginal, fluidos espermáticos, leite materno, lágrimas, fezes, e sangue; incluindo

transfusões sanguíneas e órgãos transplantados (ALFORD & BRITT, 1990; BRUGGEMAN, 1993; BROWN & ABERNATHY, 1998; BRUGGEMAN, MARJORIE & NELISSEN-VRANCKEN, 1999).

Existe uma correlação aproximada entre a prevalência do anticorpo para o vírus e as condições sócio-econômicas da população. Quando se utiliza detecção de anticorpos como marcador da infecção, a prevalência do vírus é maior em situações de pobreza. Análises de estudos de prevalência da infecção relacionada à idade sugerem pelo menos 2 períodos de aumento da infecção durante o tempo de vida: o primeiro é o período perinatal, demonstrado pela virúria; e o segundo ocorre durante os anos de maturidade sexual (hetero e homossexual) (DREW, 1988(b); MUSTAFA, 1994; BROWN & ABERNATHY, 1998).

Após a infecção, o HCMV não é eliminado. O vírus pode escapar do sistema imunológico do hospedeiro e permanecer em estado latente (como outras herpesvíroses), podendo ser reativado intermitentemente, ou persistir com baixa viremia. Estas condições permitem a transmissão do vírus a novos hospedeiros (SHEN *et al.*, 1996; BRUGGEMAN, MARJORIE & NELISSEN-VRANCKEN, 1999).

A doença clínica pelo HCMV pode ser resultante de três padrões epidemiológicos: infecção primária em indivíduos previamente soronegativos; secundária por reativação da infecção latente e ainda secundária por reinfecção por outras linhagens do vírus (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; MURRAY, 1997; PATEL & PAYA, 1997; MAYA & AZULAY, 2000). A incidência de doença sintomática é diferente nestas três formas de apresentação da infecção pelo HCMV. Cerca de dois terços dos pacientes imunocomprometidos com infecção primária desenvolvem sintomas; por outro lado, menos de 20% dos que apresentam reativação viral tornam-se sintomáticos e por volta de 40% dos reinfectedos têm sintomatologia atribuíveis ao HCMV (COSTA, 1999).

1.5- Patogênese e Manifestações Clínicas

O HCMV possui baixa patogenicidade; é um vírus citopático e conseqüentemente pode produzir destruição do tecido (ALFORD & BRITT, 1990). Os problemas relacionados aos mecanismos pelos quais os vírus escapam das defesas do

hospedeiro e invadem as células, a habilidade em infectar vários tipos celulares, o dano imunológico induzido pela infecção, os sítios de latência e os mecanismos que regulam a reativação viral têm sido alvos de estudos (CHOU, 1992).

A infecção pelo HCMV é comum e na grande maioria dos casos subclínica, no entanto, a distinção entre infecção ativa e doença causada por este vírus é fundamental. Infecção é definida quando ocorre soroconversão em pacientes soronegativos ou um aumento de 4 vezes ou mais no título de anticorpos para HCMV em pacientes soropositivos. Também quando há a circulação do vírus por qualquer fluido corporal como urina, sangue ou secreções nasofaríngeas;. Para a caracterização de doença clínica pelo HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa, faz-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com o quadro de citomegalovirose (MUSTAFA, 1994; TONG, 1997).

As manifestações clínicas e a gravidade da infecção pelo HCMV são maiores nas infecções primárias, embora possam variar de assintomáticas a grave, envolvendo risco de vida (MURRAY, 1997; ROSEN *et al.*, 1998). Pessoas saudáveis com infecção pelo HCMV geralmente são assintomáticas ou têm uma leve manifestação da doença semelhante à mononucleose, caracterizada por quadro febril prolongado, astenia, sudorese e hepatoesplenomegalia. (KRAUSE & STRAUS, 1999; COSTA, 1999).

Contudo, nas diferentes condições relacionadas à imunodepressão, o HCMV pode provocar doença grave e os grupos de maior risco são: recém-nascidos de mães infectadas (infecção congênita), receptores de transplante de órgãos, pacientes com câncer submetidos à quimioterapia, e os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (MAYA & AZULAY, 2000; COSTA, 1999).

1.6- Infecção por HCMV em Pacientes Transplantados

A infecção pelo HCMV é tida como uma das maiores causas de morbidez e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, e os principais alvos para este patógeno são os receptores de órgãos como: rim, coração, fígado e medula óssea (LJUNGMAN, 1996; PATEL & PAYA, 1997).

O risco da infecção pode estar relacionado com o estado sorológico tanto do doador quanto do receptor. É fundamental considerar o papel de imunossupressão iatrogênica no desenvolvimento da infecção, e drogas como a ciclofosfamida, azatioprina e ciclosporina têm sido implicadas como facilitadoras da doença pelo HCMV (ZAIA & FORMAN, 1995; KONTOYIANNIS & RUBIN, 1995; MAYA & AZULAY, 2000), podendo levar à replicação viral descontrolada e conseqüente infecção sintomática (PATEL & PAYA, 1997).

Além das manifestações próprias da doença viral, o HCMV parece ser imunossupressor, e a infecção por este agente foi considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de superinfecções com patógenos oportunistas (bactérias e outros vírus), além da relevância na participação do processo de rejeição aos órgãos transplantados (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; ROSEN, *et al.* 1997; MAYA & AZULAY, 2000).

Nesse grupo de pacientes, a infecção primária pode ter origem em fontes diversificadas, incluindo o próprio enxerto, ou secundária, quando o indivíduo tem infecção latente (MAYA & AZULAY, 2000), sendo que as infecções primárias geralmente são mais graves (MUSTAFA, 1994).

A onipresença deste vírus, sua tendência a ser reativado quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas e sua capacidade para disseminar a vários órgãos, são características que podem ajudar a explicar sua ocorrência freqüente na população transplantada (COSTA *et al.*, 1999).

Dentre as complicações clínicas associadas à infecção pelo HCMV estão: pneumonia intersticial, doença gastrointestinal, retinite, pancitopenia, febre, demora na pega do enxerto em receptores de medula óssea (TMO) e rejeição do enxerto entre os receptores de órgão sólido (WALTER & BOWDEN, 1995; LJUNGMAN, 1996).

1.7- Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV requer complementação laboratorial que demonstre o vírus, seus componentes, ou a presença de anticorpos específicos (MAYA & AZULAY, 2000). Estudos de tecidos com anticorpos monoclonais e

técnicas de hibridação *in situ* sugerem que infecção por HCMV pode existir em órgãos que não apresentam células citomegálicas à histologia. A fim de prevenir a progressão da infecção, técnicas rápidas e sensíveis para a detecção do vírus são exigidas para permitir que a terapia antiviral seja instituída precocemente (XU *et al.*, 1993).

O método padrão-ouro empregado para a detecção do vírus consiste em seu isolamento a partir de amostras obtidas a partir de materiais biológicos variados e inoculadas em cultura de fibroblastos. Além da complexidade envolvida com os métodos de cultura de células, a replicação lenta do HCMV faz com que seja necessário um longo período para o resultado final (PANNUTI, 1984). Uma técnica alternativa seria a detecção de anticorpos IgG e IgM contra o HCMV, contudo apresenta algumas limitações. Pacientes imunossuprimidos podem apresentar infecção grave, mas, com resposta imune inadequada, podendo levar a um resultado falso-negativo. Além disso, este tipo de detecção não é precoce e necessita, muitas vezes, de acompanhamento com exames periódicos para definição diagnóstica. Testes do tipo ELISA associados a anticorpos monoclonais para a detecção das partículas virais na urina ou soro, também têm sido utilizados (McKEATING *et al.*, 1985).

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante com a conseqüente clonagem e caracterização do HCMV, tornou possível a detecção do vírus em amostras biológicas por meio de hibridação com sondas específicas. Os métodos de diagnóstico com base na hibridação de DNA apresentam vantagens significativas sobre as técnicas clássicas, entre as quais destacam-se a precocidade no diagnóstico, sensibilidade e especificidade. Mas a complexidade de realização, utilização de isótopos radioativos e necessidade de alta carga viral para a detecção, representam inconveniência de aplicação desta metodologia (CHOU & MERIGAN, 1983).

Através de procedimentos de amplificação do DNA, por meio da reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR), a detecção do HCMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus. A amplificação gênica pela PCR é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA, a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (SAIKI, SCHARF, FALOONA, 1985).

Embora a reação em cadeia da polimerase seja extremamente sensível, algumas considerações devem ser ressaltadas (GRIFFITHS & WHITLEY, 1993). A alta sensibilidade do método levanta a questão da possível detecção de genoma de partículas virais defectivas, incapazes de produzir infecção, limitando o seu valor no diagnóstico da infecção ativa. A PCR positiva indica replicação viral, mas não é necessariamente diagnóstico de doença pelo HCMV (MAYA & AZULAY, 2000).

A técnica é muito suscetível à contaminação por produtos de amplificações prévias podendo resultar em resultados falso-positivos, sendo necessários procedimentos especiais no laboratório para se evitar tal problema; e a reação falso-negativa pode ser resultante da variação gênica entre as diferentes linhagens de HCMV (KWOK & HIGUSHI, 1989; MAYA & AZULAY, 2000). Além disso, trata-se de uma reação enzimática, e várias substâncias presentes no material examinado podem inibir a reação, levando a resultados falsos negativos (BUFFONE *et al.*, 1991; KHAN *et al.*, 1991).

Com base nos trabalhos pioneiros de DEMMLER *et al.* (1988) e de SHIBATA *et al.* (1988), a técnica de PCR foi introduzida para diagnóstico da infecção pelo HCMV, nos vários grupos de risco para esta doença. A escolha de “primers” para amplificação requer o uso de seqüências genômicas que são altamente conservadas entre HCMV distintos. Esta escolha é fundamental para garantir, sensibilidade e especificidade para o teste.

Vários trabalhos (DEMMLER *et al.*, 1988; CASSOL, 1989; HSIA *et al.*, 1989; OLIVE *et al.*, 1989; EVANS *et al.*, 1997) têm sugerido, que a técnica PCR para diagnóstico da infecção pelo HCMV produz resultados compatíveis à cultura clássica, atingindo 100% de especificidade e 93% de sensibilidade, apresentando como vantagem, uma metodologia mais rápida. Em todos estes trabalhos, os resultados foram alcançados após hibridação do produto da amplificação simples, com sondas específicas marcadas com P₃₂. Uma vantagem importante desta técnica em relação à detecção de antígeno está na maior facilidade de conservação do material (MAYA & AZULAY, 2000).

Maior sensibilidade e especificidade foram alcançadas pela técnica de “Nested PCR”, utilizada por PORTER-JORDAN *et al.* (1990) e, BRYTTING *et al.* (1991). Esta variação da PCR é uma técnica que amplifica uma seqüência alvo em dois passos: na

primeira amplificação, utiliza-se um par de “primers” específicos para um fragmento alvo desejado; a partir do produto desta 1ª reação, um novo par de “primers” é utilizado para uma região interna ao fragmento anterior, por isso o aumento da sensibilidade e especificidade da reação. Além disso, a “Nested-PCR” permite um diagnóstico mais rápido que a PCR simples seguida da hibridação específica (XU *et al.*, 1993; BRAINARD *et al.*, 1994; FOX *et al.*, 1995; EHRNST, 1996).

A antigenemia é outra técnica utilizada para o diagnóstico do HCMV e resulta na quantificação de núcleos de neutrófilos positivos, em um ensaio imunofluorescente, para a fosfoproteína viral pp65. É um marcador indireto de infecção ativa pelo vírus; altos níveis de antígenos são freqüentemente encontrados em pacientes com doença por HCMV e baixos níveis correlacionam-se com infecções assintomáticas (LANDOLFO, *et al.*, 2003). A desvantagem do método está na necessidade de processamento imediato da amostra e insuficiência de células em caso de neutropenia após transplante de medula óssea, por exemplo (BOECKH & BOIVIN, 1998).

1.8- Linhagens de Citomegalovírus Humano

As regiões gênicas do HCMV são polimórficas. Cêpas epidemiologicamente não-relacionadas são únicas ao nível de DNA (SHEPP *et al.*, 1996). Diferenças em genes funcionais (“immediate early”, glicoproteínas do envelope - gB e gH, polimerase, entre outros) podem existir entre as diversas linhagens de HCMV, influenciando sua capacidade em infectar linfócitos e células progenitoras hematopoiéticas, podendo ainda influenciar na virulência das linhagens virais (VOGELBERG *et al.*, 1996; HEBART *et al.*, 1997; WINGART *et al.*, 1998). Estas características também foram observadas em ratos (FRIES *et al.*, 1994; MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998).

As cêpas podem ser agrupadas de acordo com as similaridades no DNA e sequência de aminoácidos de certas regiões polimórficas do gene (RASMUSSEN *et al.*, 1997; SHEPP, 1998); as variações entre elas têm sido usadas como marcadores genéticos em diversos estudos clínicos e consideram sua associação com a patogênese viral (HEBART *et al.*, 1997; TOROK-STORB *et al.*, 1997; RETIÈRE *et al.*, 1998; AQUINO & FIGUEIREDO, 2000).

Com a introdução da PCR seguida da análise de restrição (PCR-RFLP), foi possível caracterizar a variabilidade genética do vírus, tornando-se uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1991; SOUZA *et al.*, 1995; LASRY *et al.*, 1996).

1.8.1-. Glicoproteína B (UL55)

A glicoproteína B é talvez o componente do envelope viral mais altamente conservado. É uma proteína essencial para a replicação do vírus *in vitro* e *in vivo*, importante no processo de adsorção na célula hospedeira e disseminação do vírus célula a célula; ela é também um importante alvo da resposta imune humana que induz à formação de anticorpos de neutralização (BRITT & MACH, 1996; LASRY *et al.*, 1996; SHEPP *et al.*, 1996; BONGARTS *et al.*, 1996; ALBEROLA *et al.*, 1998).

Certas regiões do gene gB são altamente variáveis entre as diferentes cepas de HCMV, estando uma delas situada próxima ao sítio de clivagem da protease (entre os aminoácidos 460 e 461) e está envolvida no processo de fusão com a célula hospedeira (VOGELBERG *et al.*, 1996).

Através de análises por RFLP no gene que codifica a glicoproteína B, foi possível a distinção de pelo menos 4 genótipos gB (HEBART *et al.*, 1997; TOROK-STORB *et al.*, 1997). A genotipagem do HCMV foi também desenvolvida para ser aplicada em estudos epidemiológicos, determinando a frequência de reinfecção e ajudando no entendimento da transmissão viral (AUGUSTYNOWICZ & DZIERZANOWSKA, 1998).

Mais recentemente, a técnica de SSCP (“Single Strand Conformation Polymorphism”) tem sido utilizada para a caracterização viral, pois é capaz de discriminar, em fragmentos de DNA do mesmo tamanho, variação em sua sequência. A técnica é baseada na migração das fitas de DNA que, quando desnaturadas, apresentam um padrão de migração em gel de acrilamida alterado, em caso de variação genética (PALACIO & DURAN-VILA, 1999). Além de fornecer padrões eletroforéticos conformacionais

característicos para os subtipos de HCMV descritos, a SSCP pode permitir a detecção de alterações na sequência alvo que não são reconhecidas pela endonuclease de restrição e que podem originar novas variantes virais (BINDER *et al.*, 1999; ALBUQUERQUE & COSTA, 2003).

Estudos revelam a prevalência de determinados genótipos entre os diferentes grupos de pacientes imunocomprometidos estudados. TOROK-STORB *et al.* (1997), descrevem em seu estudo com transplantados de medula óssea, a correlação dos tipos gB3 e gB4 com morte por mielossupressão, e risco reduzido de GVHD (doença do enxerto contra o hospedeiro) agudo de graus II a IV (TOROK-STORB *et al.*, 1997). Nesse grupo de pacientes, o subtipo gB1 foi encontrado mais comumente em pessoas que sobreviveram à infecção pelo HCMV, com melhor prognóstico (FRIES *et al.*, 1994).

Foi relatado por WADA *et al.* (1997), diferença na distribuição das linhagens do HCMV entre raças. Eles descrevem a prevalência da gB2 na população asiática de transplantados de medula óssea, enquanto em populações caucasianas o subtipo prevalente foi o gB1.

A coinfeção com múltiplos genótipos gB em pacientes imunocomprometidos está associada com maior carga viral, maior prevalência de doença por HCMV, e maior grau de rejeição do órgão, além disso, são frequentemente concomitantes à infecção com outras herpesvíroses (COAQUETTE *et al.*, 2004). As diferenças observadas no tropismo e virulência de diferentes genótipos gB podem ser determinadas pela proteína gB e de acordo com as funções por ela exercidas. Devido ao tropismo viral e patogenicidade serem frequentemente ligados, os resultados apresentados por MEYER-KÖNIG *et al.* (1998) evidenciam a hipótese de que a variabilidade genética em gB influencia a virulência do HCMV.

1.9- Determinação da Carga Viral

O potencial de investigações virológicas tem aumentado significativamente seguido do desenvolvimento de técnicas quantitativas confiáveis para diagnóstico viral, e deste ponto de vista, a tecnologia molecular quantitativa representa um importante

marcador da virologia na década de 90 (CLEMENTI, 2000). É provável a associação entre a carga viral como marcador ou preditor para o desenvolvimento de doença órgão-específica pelo HCMV (LIPSON *et al.*, 1998; FERREIRA-GONZALEZ *et al.*, 1999; SIA *et al.*, 2000). Além disso, a habilidade de quantificar a carga viral promete mudar o modo de como a terapia antiviral é utilizada. Tem sido demonstrado que o aumento da carga viral no plasma de pessoas com AIDS está associado com risco para doença por HCMV no sistema nervoso central. Já em pacientes transplantados de medula óssea, não há evidências de que a determinação do número de cópias viral no plasma possa ser utilizada para monitoramento da profilaxia antiviral (ZAIA *et al.*, 1997).

Metodologias para detectar e quantificar o vírus ou componentes virais têm sido desenvolvidas, entre elas: viremia – que quantifica a infecção pelo vírus em leucócitos do sangue periférico (PBL) após cultivo em fibroblastos humanos; antigenemia – quantifica uma proteína do HCMV (pp65) que é produzida em excesso durante a replicação viral e é acumulada no núcleo dos neutrófilos de pacientes imunocomprometidos infectados pelo vírus; leucoDNAemia (L-DNA) e plasmaDNAemia (P-DNA) – quantifica o DNA viral nos PBLs ou plasma através da PCR quantitativa; e ainda os métodos de hibridação e PCR *in situ* – para detecção do ácido nucléico viral em células ou cortes de tecidos e detecção do menor número de cópias virais em uma única célula, respectivamente; e a determinação dos transcritos dos genes IE e L (mRNA) para detectar infecção viral ativa (GERNA *et al.*, 1998(b); GOOSSENS *et al.*, 2000). No entanto, nenhuma delas, isoladamente, tem oferecido resultados definitivos em relação à significância clínica para o monitoramento da infecção pelo HCMV e eficácia do tratamento antiviral precoce (GERNA *et al.*, 1998(a); BOECKH & BOIVIN, 1998).

Estudos baseados na viremia têm fornecido evidências claras que alterações na carga viral durante as diferentes fases da infecção persistente podem ser eficientemente avaliadas pela quantificação do vírus no plasma e que o aumento substancial na carga viral pode estar relacionado com a progressão da doença por HCMV (CLEMENTI, 2000).

GERNA *et al.* (1998a), concluíram em estudo, que a quantificação através da L-DNAemia representa uma metodologia de escolha para o monitoramento da infecção primária em receptores de órgãos sólidos, com resultados comprobatórios e consistentes da

associação dos níveis encontrados com manifestações clínicas. Além do mais, o valor da carga viral está relacionado com o grupo de paciente (e/ou tipo de transplante), patogênese do HCMV e níveis de imunossupressão, e pode determinar o início da terapia antiviral (MENDEZ *et al.*, 1998).

O método da antigenemia tem sido associado com alta sensibilidade e especificidade para a detecção precoce de doença por HCMV (SIA & PATEL, 2000). As desvantagens desta técnica são: a necessidade de processamento imediato das amostras para se obter uma sensibilidade ótima (SCHAFER *et al.*, 1997), a variabilidade entre ensaios e necessidade de um número suficiente de leucócitos para realização do teste (LIMAYE *et al.*, 1997). Outros testes são baseados em ensaios de hibridação e métodos de amplificação para a detecção precoce do DNA do HCMV. O PCR qualitativo tem pequeno valor clínico e pode não discriminar entre infecção latente e infecção ativa causada pelo vírus (MONTE *et al.*, 1996).

A mensuração da carga viral pela PCR quantitativa parece ser importante para o diagnóstico e prognóstico de doença por HCMV, para diferenciar entre infecção latente e ativa e para o monitoramento da terapia antiviral. Métodos automatizados para padronizar a detecção do HCMV por PCR podem aumentar a sensibilidade e reprodutibilidade (MARTÍN-DÁVILA *et al.*, 2005).

A PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR) é uma técnica altamente precisa e menos trabalhosa que outras metodologias quantitativas baseadas em PCR previamente descritas, não necessita manuseio pós-reação, evitando potenciais contaminações com produtos amplificados e sendo uma técnica mais rápida e com melhor rendimento. A RT-PCR utilizando o sistema *TaqMan* gera um sinal pela clivagem de uma sonda oligodeoxinucleotídica fluorogênica alvo-específica durante a amplificação. Desta forma, os produtos amplificados são quantificados durante a fase exponencial da reação.

A metodologia de “real time” é considerada superior a outros métodos de PCR quantitativos existentes, devido a acurácia, simplicidade, rapidez e reprodutibilidade (YOSHIDA *et al.*, 2001). O valor resultante do número de partículas virais é utilizado como uma ferramenta para o monitoramento do tratamento antiviral, um determinante da adequação do tratamento, e como preditor para doença por HCMV (SIA *et al.*, 2000).

A escolha entre detecção da carga viral em leucócitos ou em plasma permanece controversa. É provável que a carga viral seja relativamente baixa no plasma, no entanto, uma das razões para a escolha deste tipo de material para a análise quantitativa é de ordem clínica, além de ser mais prático para transporte e nos procedimentos de preparação e mais estável (HONG *et al.*, 2004). Além disso, o tipo de hospedeiro e o tipo de doença por HCMV podem influenciar a quantidade de DNA do vírus em amostras de sangue de sujeitos virêmicos, por exemplo, pacientes com AIDS com retinite por HCMV têm um grau de viremia significativamente maior que sujeitos com doença visceral causada por HCMV (BOIVIN *et al.*, 1997).

A RT-PCR no plasma parece ser um marcador mais precoce e mais sensível de doença causada pelo HCMV que em leucócitos, no entanto tem menor sensibilidade e pode tornar-se positiva mais tarde, em relação ao PCR em leucócitos (NAJIOULLAH, THOUVENOT & LINA, 2001).

A terapia preventiva é uma estratégia para evitar doença por HCMV em pacientes transplantados. Está baseada na administração de agentes antivirais após o transplante para indivíduos com marcadores biológicos que predizem doença por HCMV, além disso, o sucesso da terapia preventiva está diretamente relacionado a bons marcadores para replicação viral (MÁRTÍN-DÁVILA *et al.*, 2005).

1.10- Resistência ao Agente Antiviral

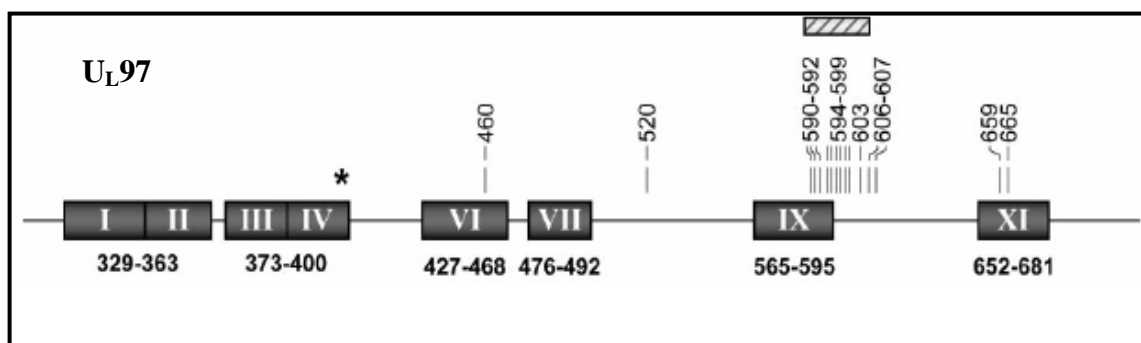
Resistência viral parece ser um problema emergente em pacientes transplantados e tem sido associada com aumento do número de episódios virêmicos assintomáticos e sintomáticos, o início precoce da doença por HCMV, perda do enxerto, e o aumento do risco de morte. Devido às estratégias adotadas para prevenção da infecção pelo HCMV e os diferentes regimes imunossupressivos usados pelos diversos centros e considerando a heterogeneidade da população transplantada, tem sido difícil avaliar, precisamente, o surgimento da resistência viral a agentes antivirais (GILBERT & BOIVIN, 2005).

O tratamento da infecção ativa causada pelo HCMV está limitado aos agentes antivirais Ganciclovir, Foscarnet e mais recentemente ao Cidofovir, Valganciclovir e Fomivirsen. Ganciclovir, um análogo nucleosídeo, foi o primeiro agente antiviral virostático com atividade comprovada contra o HCMV *in vitro* e *in vivo*. O principal efeito colateral é a neutropenia e mielossupressão, responsáveis pela interrupção no tratamento; outros efeitos menos freqüentes são: plaquetopenia, alterações hepáticas, neurológicas e renais (HIBBERD & SNYDMAN, 1995; COSTA, 1999; MAYA & AZULAY, 2000).

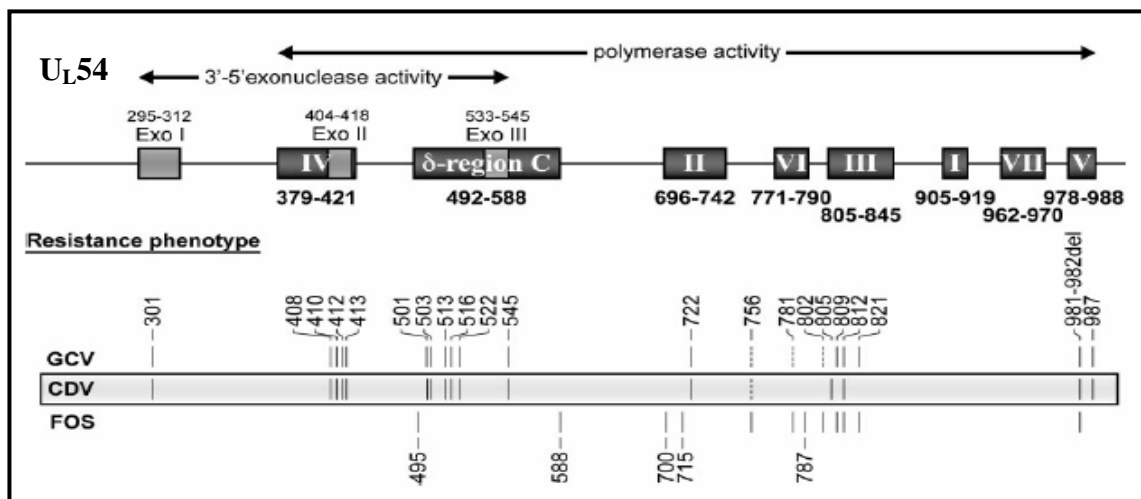
Duas técnicas diferentes, mas complementares, têm sido desenvolvidas para avaliar a resistência do HCMV a drogas. Um dos métodos fenotípicos adotados é o ensaio com cultura viral na presença de várias concentrações de um antiviral, realizado a fim de determinar a concentração da droga que inibirá uma porcentagem do crescimento viral. Métodos genotípicos detectam mutações virais associadas à resistência a drogas, e estão baseados em análise de restrição e sequenciamento dos genes virais envolvidos no processo de resistência (GILBERT & BOIVIN, 2005).

Resistência antiviral tem sido apresentada como resultado de alterações em duas enzimas codificadas pelo vírus, a DNA polimerase viral (UL54) e a fosfotransferase (UL97) (LURAIN *et al*, 1996). A manutenção da terapia antiviral com Ganciclovir pode originar cêpas que apresentam mutações: 1- no gene UL97 (principalmente nos códons 460, 520, e 591-607) que codifica uma fosfotransferase essencial para a monofosforilação do antiviral; 2- no gene UL54 que codifica a DNA polimerase do HCMV (ZHOU *et al*, 1999; BALDANTI *et al.*, 2002).

Os quadros a seguir, adaptados de GILBERT & BOIVIN (2005), representam a seqüência esquemática dos genes UL97 e UL54, respectivamente, indicando as mutações e/ou regiões de maior freqüência de mutações relacionadas à resistência aos agentes antivirais.



Mutações no gene UL97 que conferem resistência a agentes antivirais.



Mutações no gene UL54 que conferem resistência a agentes antivirais.

A proteína UL97 é um componente estrutural do vírion com propriedades de autofosforilação, responsável pela monofosforilação do Ganciclovir nas células infectadas pelo HCMV e está envolvida no mecanismo de resistência a este agente antiviral. Embora tenha um papel importante no ciclo de replicação viral, a verdadeira função desta proteína não está completamente elucidada. Outra proteína envolvida no mecanismo de resistência é a DNA polimerase viral (UL54), envolvida na atividade de polimerização das polimerases em geral (GILBERT & BOIVIN, 2005).

Estudos correlacionam a carga de DNA viral e mutações associadas à resistência com a apresentação clínica do paciente (BOIVIN *et al.*, 1997; BOWEN *et al.*, 1998). GILBERT *et al.* (1998) relatou, em seu estudo, que estas mutações estão associadas a um considerável aumento na carga de DNA de HCMV no sangue e progressão da doença durante a terapia com Ganciclovir.

Linhagens resistentes ao Ganciclovir podem originar-se durante o tratamento antiviral oral de pacientes transplantados e a utilização de metodologias rápidas de detecção do vírus resistente à droga é importante no fornecimento de bases para adoção de estratégias terapêuticas alternativas (BALDANTI *et al.*, 1998).

CHOU *et al.* (1998) observaram a presença de mutações típicas para o gene UL97 nos pacientes por eles estudados e concluíram que mais de 90% dos isolados clínicos resistentes ao Ganciclovir tinham mutações nesse gene. Mutação somente no gene UL54 que confere resistência ao Ganciclovir é incomum, mas mutações nos dois genes podem coexistir.

A prevenção da infecção por HCMV é possível para a maioria dos pacientes, entretanto, algumas questões relevantes devem ser consideradas: o valor preditivo da carga viral para doença por HCMV, resistência viral, além do custo e disponibilidade da terapia preventiva (LEGENDRE & THERVET, 2000).

2- OBJETIVOS

Sabendo-se a importância da identificação das linhagens de Citomegalovírus Humano em pacientes imunocomprometidos, sua possível relação com a infectividade e apresentação clínica; a relevância da determinação da carga viral em pacientes submetidos a transplantes, bem como a detecção de linhagens resistentes ao tratamento antiviral, este trabalho prospectivo avaliou pacientes transplantados de medula óssea em seguimento no HEMOCENTRO/UNICAMP, tendo como objetivos principais:

- 1- Determinar a prevalência dos genótipos gB do Citomegalovírus Humano em pacientes transplantados de medula óssea (TMO) em seguimento no Hemocentro/UNICAMP e associa-los com a apresentação clínica da doença;
- 2- Monitorar a terapia antiviral instituída através da determinação da carga viral e surgimento de linhagens resistentes;
- 3- Correlacionar a presença de mutações que conferem resistência ao Ganciclovir com a carga viral do Citomegalovírus Humano e manifestações clínicas nesses pacientes;

3- CASUÍSTICA

De forma prospectiva foram analisadas 169 amostras de DNA extraído de sangue periférico e 187 amostras de DNA extraído de soro de 22 pacientes transplantados de medula óssea, em seguimento no Hemocentro da UNICAMP no período de fevereiro de 2003 a julho de 2004, diagnosticados com: Leucemia Mielóide Crônica (LMC)⁶, Mieloma Múltiplo (MM)³, Linfoma Não-Hodgkin (LNH)⁶, Anemia Aplástica (AA)¹, Leucemia Mielóide Aguda (LMA)⁴ e Linfoma Hodgkin (LH)².

A confirmação laboratorial de infecção pelo HCMV foi realizada no “Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular”, através da técnica “Nested-PCR”. A tabela 01 mostra os pacientes estudados, com distribuição por sexo, idade, doença de base, tipo de transplante e de enxerto e datas da coleta das amostras. Os pacientes seguidos tinham em média 45 anos (as idades variaram de 21 a 62 anos), 13 deles pertenciam ao sexo masculino e 9 ao sexo feminino.

Tabela 1- Características dos pacientes incluídos no estudo.

Pac. Nº	Sexo	Idade	Doença de Base	Tipo Transplante	Enxerto	Coletas Sangue	Coletas Soro
1	M	34	LMC	alogênico	MO	-1, +32, +46,+61, +75, +89, +104, +119, +137, 154	-1, +7, +14,+20, +32, +46, +61,+75, +89, +104, +119, +137, +154
4	F	57	LMC	alogênico	CPP	-1, +14,+29, +47, +62, +77, +89, +105, +120, +140, +154	-1, +7, +14,+29, +47, +62, +77, +89, +105, +120, +140, +154
5	F	59	MM	autólogo	CPP	+14, +29, +44, +64, +79, +93, +106, +123	+7, +14, +29, +44, +79, +93, +106, +123
6	M	40	LMC	alogênico	CPP	0, +21, +36, +42, +63, +69, +83, +111, +130, +139, +156	0, +7, +14, +21, +36, +42, +63, +69, +83, +111, +130, +139, +156
8	M	55	LNH	autólogo	CPP	-3, +14, +35, +52, + 67, +80, +101, +116, +141, +156	+7, +14, +35, +52, + 67, +80, +101, +116, +141, +156
10	M	51	MM	autólogo	CPP	0, +9, +29, +44, +59, +74, +91, +106, +123, +140, +155	0, +9, +29, +44, +59, +74, +91, +106, +123, +155
11	F	54	LNH	autólogo	CPP	+29, +42, +57, +79, +120, +128, +146	+8, +15, +23, +29, +42, +57, +79, +120, +128, +146
12			LNH			+26, +41, +69	
13	M	59	MM	autólogo	CPP	-3, +21, +35, +50, +67, +78, +93, +113, +121, +136	-3, +7, +21, +35, +50, +67, +78, +93, +113, +121, +136
14	F	21	AA	alogênico	MO	-1, +20, +28, +41, +56, +64, +85, +127	-1, +13, +20, +28, +41, +56, +64, +85, +127, +154
15	M	27	LMA	alogênico	MO	-1, +21, +48, +69, +104, +131, +146	-1, +7, +14, +21, +48, +69, +104, +131, +146
17	F	57	LMC	alogênico	MO	-1, +20, +33, +48, +56, +71, +81, +98, +126, +141, +159	-1, +8, +13, +20, +33, +48, +56, +81, +98, +126, +141, +159
18	M	35	LNH	autólogo	CPP	-1, +43, +62, +78, +94, +121, +142, +157, +168	-1, +8, +43, +62, +78, +94, +121, +141, +157, +168
19	F	44	LMC	alogênico		-1, +25, +40, +57, +68	-1, +6, +13, +25, +40, +57, +68
20	F	41	LMA	alogênico	CPP	-1, +13, +26, +41, +61, +84, +99, +111, +118, +152	-1, +6, +13, +26, +41, +61, +84, +99, +118, +152
21	M	40	LNH	autólogo	CPP	-1, +18, +25, +41, +60, +76, +95, +124, +144, +152	-1, +6, +18, +25, +41, +60, +76, +95, +124, +144, +152
22			LH				
23	M	62	LNH	autólogo	CPP	-1, +12, +55, +69, +83, +103, +118, +136	-1, +6, +12, +55, +69, +83, +103, +118, +136
24	M	27	LH	autólogo	CPP	0, +19, +46, +64, +81, +104	0, +8, +19, +46, +64, +81, +104
25	F	43	LMA	alogênico	CPP	+28, +40, +57, +71	+28, +40, +57, +71
26	M	33	LMA	alogênico		-3, +17, +37, +58, +70	
27	F	53	LMC	alogênico	MO	-1, +14, +49, +67, +98	

Legenda: M - Masculino; F – Feminino; LMC – Leucemia Mielóide Crônica; MM – Mieloma Múltiplo; LNH – Linfoma Não-Hodgkin; AA – Anemia Aplástica; LMA – Leucemia Mielóide Aguda; LH – Linfoma de Hodgkin; MO – Medula Óssea; CPP - Células Progenitoras Periféricas. Dias da coleta: (-) dias antes do transplante; (0) dia do transplante; (+) dias pós-transplante.

4- MÉTODOS

Os métodos utilizados para a detecção da presença de CMV nos pacientes estudados foram:

4.1- Extração do DNA

Preparação das amostras:

As amostras de sangue periférico, recebidas em tubo com anticoagulante (EDTA), foram processadas até cerca de 2 horas pós-coleta para separação do plasma, que foi armazenado em freezer -80°C .

Lise das hemácias:

As hemácias (sedimentadas) foram lisadas com uma mistura de soluções de cloreto de amônio (NH_4Cl) 0,144M - 5 vezes o volume de células e bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0,01M - 0,5 vez o volume de células. Após quinze minutos em repouso à temperatura ambiente, o hemolisado foi centrifugado durante 20 minutos a 2500 rpm, esta etapa foi repetida mais uma vez, e posteriormente o sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos submetido à etapa seguinte.

Lise de Leucócitos:

Os leucócitos foram lisados com lavagens de solução TKM1 (Tris-HCl 10mM (pH=7,6); KCl 10mM; MgCl_2 10mM e EDTA 20mM), sendo centrifugados por 10 minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foram adicionadas 3 gotas de Triton X-100 (Nuclear), na primeira lavagem. A segunda lavagem não continha nenhum desses dois últimos especificados; o sobrenadante foi descartado e após essa etapa, foi acrescentada, ao precipitado, a solução TKM2 (0,8ml da solução contendo Tris-HCl 10mM (pH=7,6); KCl 10mM; NaCl 0,4 M; MgCl_2 10mM; EDTA 2 mM; 0,025ml de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida o material foi incubado durante 40 minutos a uma temperatura de 56°C e então foi adicionado 0,3 ml de NaCl 5M. Nessa etapa o precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um tubo estéril.

Precipitação do DNA:

Ao sobrenadante foram adicionados 4,0 ml de etanol absoluto gelado (EtOH), ocorrendo a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado em 1,0 ml de álcool 70% gelado e a seguir foi centrifugado. Descartado o sobrenadante, o DNA precipitado foi seco à temperatura ambiente e solubilizado com água destilada, deionizada e estéril (dH₂O); sendo deixado por 8 horas em banho-maria a 37°C, ou levado a uma temperatura de aproximadamente 4°C, por 16 horas e sua concentração foi estimada em espectrofotômetro, por meio do valor da densidade óptica em comprimento de onda de 260 nm. (SAMBROOK, FRITSCH, MANIATS, 1989).

4.2- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção do CMV

Condições da reação:

A reação em cadeia da polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al.* (1985 e 1988) com algumas modificações. Para a identificação do HCMV, a PCR foi adaptada a partir de BRYTTING *et al.*, 1991 e compreendeu na utilização de 0,5 µl do DNA alvo (cerca de 100ng) para um volume total de 20,0 µl de reação. Foram adicionados 2,0 µl do tampão da enzima 10X (50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 2,0 µM de cada “primer” MIE 4 e MIE 5, 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,04 unidades de *Taq* DNA polimerase.

As condições de reação para a *n*PCR foram as mesmas utilizadas na 1ª PCR. Nesse caso, uma alíquota do produto da 1ª reação foi usada como molde para amplificação com o par de “primers” interno ao fragmento anterior (IE – “immediate early”). (*tabela 2*).

Tabela 2- Seqüência dos “primers” utilizados para a detecção do Citomegalovírus Humano.

Nome	Seqüência	Sentido	*Localização
MIE 4	5' CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC 3'	“antisense”	171509
MIE 5	5' CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG 3'	“sense”	171075
IE 1	5' CCACCGCTGGTGTGTCAGCTCC 3'	“antisense”	171314
IE 2	5' CCCGCTCCTCCTGAGCACCC 3'	“sense”	171172

Seqüência de “primers” descrita por BRYTTING *et al.*, 1991. * Localização referente à cepa AD169 (ID: X17403).

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

Para a 1ª reação, os ciclos de amplificação empregados para cada amostra compreenderam:

- Desnaturação: 94°C - 1 minuto;
 - Anelamento: 55°C - 1 minuto;
 - Extensão: 72°C - 1 minuto.
- } 30 vezes

E para a “Nested-PCR” houve uma pequena alteração no ciclo de amplificação:

- Desnaturação: 94°C - 40 segundos;
 - Anelamento: 55°C - 40 segundos;
 - Extensão: 72°C - 1 minuto.
- } 30 vezes

Detecção:

Cerca de 5,0µl do produto da *n*PCR acrescidos de 2,0µl do corante azul de bromofenol, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Em amostras positivas observou-se um fragmento de 159 pares de bases. Como controle positivo da reação, foi usada uma alíquota do extrato viral da cêpa AD169 do HCMV; como controle negativo, uma amostra certamente negativa para o vírus e como branco de reação, a água.

4.3- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para a β -globina humana

Como controle interno de reação utilizamos a amplificação de um fragmento do gene da β -globina humana, seguindo o protocolo descrito por MIRANDA *et al.*(1997) com algumas modificações. O fragmento obtido (771 pb) indicou que o DNA extraído era de boa qualidade e não houve inibição da reação - resultado indispensável para um diagnóstico seguro.

As condições de reação utilizadas para a amplificação do gene da β -globina foram as mesmas aplicadas para a detecção do HCMV. Os “primers” utilizados nessa reação estão descritos na tabela 03.

Tabela 3- Sequência dos “primers” utilizados para amplificação do gene da β -globina humana.

Nome	Sequência	Sentido	*Localização
P1	5' TCCTAAGCCAGTGCCAGAAG 3'	“sense”	61976
P5	5' TCATTTCGTCTGTTTCCCATTTC 5'	“antisense”	62746

Sequência de “primers” descrita por MIRANDA *et al.*, 1997. * Localização referente ao gene da β -globina humana localizado no cromossomo 11 (ID: U01317).

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em termociclador Robocycler 40 (Stratagene). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final.

- Desnaturação: 94°C - 1 minuto;
 - Anelamento: 55°C - 1 minuto;
 - Extensão: 72°C - 1 minuto.
- } 30 vezes

O produto foi submetido   eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.4- Normas aplicadas para se evitar contamina o

A fim de se eliminar problemas de contamina o das re  es, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos, foram tomados os seguintes cuidados:

- O ambiente utilizado para a extra o do DNA foi diferente daquele destinado   amplifica o da seq ncia alvo (PCR);
- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em bancada com fluxo laminar, o que torna o ambiente estéril;
- Um outro ambiente foi utilizado para se realizar a eletroforese;
- Antes da abertura dos “eppendorffs”, foi efetuada rápida centrifuga o para que a re  o contida no tubo ficasse concentrada na região inferior evitando sua dispersão por aerossol;
- Materiais utilizados (ponteiras e “eppendorffs”) eram novos e estéreis; para manipula o da amostra, utilizamos ponteiras com filtro;
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

4.5- Identificação das linhagens de HCMV

A identificação das diferentes cepas do HCMV foi feita a partir do DNA de pacientes que obtiveram *n*PCR positiva para a região MIE do vírus.

Condições da reação:

Para a primeira reação utilizamos 0,5 µl (cerca de 100ng/µl) da amostra de DNA HCMV positiva para um volume total de 25,0 µl de reação. Foram adicionados 10% do volume total de reação de Tampão 10X (50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 2,0 mM de cloreto de magnésio, 120 nM dos “primers” gB1319 e gB1659 (**Tabela 4**), 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,02 unidades de *Taq* DNA polimerase.

Tabela 4- Sequência dos “primers” utilizados para a amplificação da glicoproteína gB do Citomegalovírus Humano.

Nome	Sequência	Sentido	*Localização
gB 1319**	5' TGGAATTGGAACGTTTGGC 3'	“antisense”	82174
gB 1659	5' GCACCTTGACGCTGGTTTGG 3'	“sense”	81812
gB 1604	5' GAAACGCGCGGCAATCGG 3'	“sense”	81873

Os “primers” gB 1319 e gB 1604 foram descritos por CHOU, 1990; gB 1659 por VOGELBERG *et al.*, 1996.

* Localização referente à cepa AD169 (ID: X17403).** O “primer” gB1319 foi utilizado para as duas reações.

Para a 1ª reação, trinta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em termociclador GeneAmp® PCR System 9600 (Applied Biosystems). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 96°C durante 2 minutos e no final, 5 minutos a 72°C para a extensão final.

O ciclo de amplificação para a 1ª reação compreendeu:

- Desnaturação: 96°C – 30 segundos;
 - Anelamento: 55°C – 30 segundos;
 - Extensão: 72°C - 1 minuto e 30 segundos.
- 30 vezes

Na etapa seguinte mantivemos a concentração dos reagentes para um volume total de reação de 50,0 µl. Nesse caso, adicionamos 0,6 µl do produto da 1ª PCR como molde e o par de “primer” usado foi gB 1319 e gB 1604.

O ciclo da “Nested-PCR” para a gB foi o seguinte:

- Desnaturação: 96°C - 30 segundos
 - Anelamento: 60°C - 30 segundos;
 - Extensão: 72°C - 1 minuto.
- 35 vezes

Deteção:

Cerca de 5,0 µl do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

Análise de Restrição (PCR-RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”):

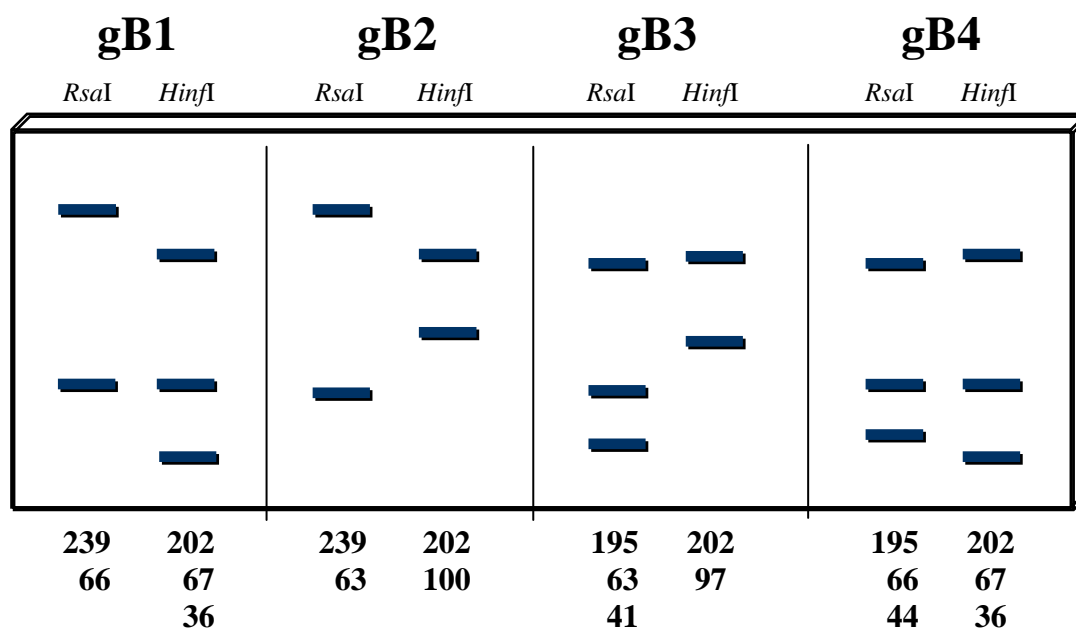
Após confirmação da amplificação, os produtos da gB foram digeridos com enzimas de restrição para a determinação das linhagens de HCMV (CHOU *et al.*, 1990). Utilizamos as enzimas *Hinf* I e *Rsa* I, para a clivagem da região gB (**quadro 1**).

Cerca de 8,0 µl do produto amplificado foi utilizado para a execução da reação de digestão, que continha também, 1,5 µl do tampão da enzima 10X e 0,3 µl da enzima (3 unidades) correspondente. Água deionizada e estéril foi adicionada para completar o volume de 15,0 µl e a mistura foi conduzida ao banho-maria a 37°C overnight.

Os fragmentos produzidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) 2,0% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

As diferentes linhagens de HCMV apresentam padrões de digestão característicos (CHOU *et al.*, 1990), que são considerados para a distinção entre os genótipos de HCMV.

Quadro 1- Padrão de digestão para a glicoproteína B de Citomegalovírus Humano utilizando-se as enzimas *RsaI* e *HinfI*.



4.6- PCR Quantitativa em Tempo Real

A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR (HIGUCHI, FOCKLER *et al.*, 1993), através da ligação de uma sonda específica ou um corante, na fita recém sintetizada.

O primeiro passo a ser realizado foi a clonagem de DNA viral correspondente a um fragmento do gene US17 (**Tabela 5**) para construção da curva padrão com valores pré-determinados de carga viral e se deu da seguinte maneira:

Clonagem do produto da PCR

O produto amplificado foi ligado em vetor pGEM-T Easy Vector (PROMEGA), conforme recomendações do fabricante.

A 200,0 µl de células competentes dH5α, acrescentou-se 5,0 µl da reação de ligação e a mistura foi submetida às seguintes condições: 20 minutos no gelo, 1 minuto 30 segundos a 42°C e imediata transferência para o gelo. A reação então foi misturada em 800,0 µl de meio líquido “SOC” (10mM de cloreto de magnésio, 10mM de sulfato de magnésio, 20mM de glicose, triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio, cloreto de potássio) e permaneceu sob agitação de 220 rpm à 37°C por 1 hora. Após centrifugação a 3000 rpm por 1 minuto, descartou-se 600,0 µl do meio; o restante foi ressuspenso e 150,0 µl foram utilizados para o plaqueamento.

Colônias de bactérias foram obtidas após incubação overnight a 37°C e colônias brancas (que possuem o inserto) foram coletadas e proliferadas em meio líquido “CircleGrow” (Pharmacia), a 37°C a 120 rpm, overnight.

Em seguida, uma alíquota do sobrenadante foi submetida à amplificação utilizando-se “primers” do vetor (M13 Forward e M13 Reverse) para posterior sequenciamento e confirmação da sequência inserida no vetor. A etapa seguinte foi a purificação do produto clonado utilizando-se o kit Concert™ Rapid Plasmid Miniprep System (Gibco-BRL) seguido da linearização do produto com a enzima *EcoRI* e posterior quantificação em espectrofotômetro (Nanodrop®).

Foi padronizada a concentração ótima de “primer” e sonda a ser utilizada na PCR quantitativa em tempo real, que deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias da sequência alvo presente na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra (uma diluição do produto clonado purificado) foram feitas reações contendo cada um dos “primers” (*forward e reverse*) na concentração final de 150nM, 300nM, 600nM e 900nM. Considerando que se utilizou a mesma quantidade de amostra em todas as reações, os Cts (Cycle Threshold – ciclo de amplificação) não deveriam variar. Se o aumento da concentração de “primer” ocasionou diminuição no Ct, a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor Ct.

Eficiência de reação

Utilizando a concentração ótima de “primer” e sonda, foi determinada a eficiência da reação. Para tanto foram realizadas reações com amostras diluídas em escala logarítmica, cujos resultados geraram uma curva padrão Ct *versus* quantidade de amostra. A eficiência de amplificação é obtida a partir da fórmula $E = 10^{(-1/slope)}$, onde *slope* corresponde ao coeficiente de inclinação da reta (PFAFFL, 2001), dado pelo programa GeneAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems).

As amostras de soro, previamente separadas, foram submetidas à extração de DNA através do kit QIAamp® MinElute™ Virus Spin (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A reação de amplificação em tempo real foi feita da seguinte maneira: 10,0 µl da solução de DNA extraída do soro, 300nM de cada primer (US17_F e US17_R – (tabela 5), 300nM da sonda (tabela 5) , 12,5µl de tampão universal (Applied), para um volume final de reação de 25,0µl, completados com água deionizada e estéril. O produto foi então submetido às condições de ciclagem:

- Inativação do Anticorpo: 50°C – 2 minutos
 - Desnaturação inicial: 95°C – 10 minutos
 - Desnaturação: 60°C - 30 segundos
 - Anelamento/Extensão: 60°C - 1 minuto
- } 45 vezes

Tabela 5- Sequência dos “primers” e sonda utilizados para a PCR em Tempo Real.

Nome	Sequência	*Localização
US17_R	5' GCGTGCTTTT TAGCCTCTGCA 3'	205675
US17_F	5' AAAAGTTTGTGCCCCAACGGTA 3'	205525
Sonda	5' FAM- TgATCggCgTTATCgCgTTCTTgATC- TAMRA 3'	205566-205591

Primers e sonda descritos por MACHIDA *et al.*, 2000. * Localização referente à cepa AD169 (ID: X17403).

Os resultados foram então analisados através do GeneAmp 7500 Sequence Detector System[®] Software (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (“threshold”) é denominado ciclo de “threshold” ou Ct. Quanto maior a carga viral, ou seja, quanto mais cópias virais existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e, conseqüentemente, menor é o Ct.

4.7- Resistência a Agentes Antivirais

Foram estudados dois genes do Citomegalovírus Humano que conferem resistência ao Ganciclovir: 1- gene UL97 (PHOS) que codifica uma fosfotransferase que é essencial para a monofosforilação do Ganciclovir; 2- gene UL54 (POL) que codifica a DNA polimerase do HCMV.

Os “primers” utilizados para amplificação da região de maior variabilidade do gene da fosfotransferase estão relacionados na tabela 06 e para o gene da polimerase viral estão na tabela 07. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen), a seguir foi purificado com o kit GFX (Amersham/GE) e quantificado em gel de agarose 1,5% utilizando um marcador de massa molecular (Low DNA Mass Ladder – Invitrogen) para posterior seqüenciamento.

Tabela 6- Seqüência de “primers” para detecção de mutações relacionadas à resistência a agentes antivirais para o gene da fosfotransferase (UL97) do HCMV.

Nome	Seqüência	Sentido	*Localização
1 PHOS_F**	5' GTTGGCCGACGCTATCAAAT 3'	“sense”	141797
2 PHOS_R	5' GGTCCTCCTCGCAGATTATG 3'	“antisense”	142572
3 PHOS-R**	5' CAGACGCTCCACGTTCTTTC 3'	“antisense”	142499

“Primers” descritos por PRIX *et al.*, 1999. * Localização referente à cepa AD169 (ID: X17403). Os “primers” marcados (**) foram utilizados na *n*PCR e também na reação de seqüenciamento.

Tabela 7- Seqüência de “primers” para detecção de mutações relacionadas à resistência a agentes antivirais para o gene da DNA polimerase (UL54) do HCMV.

Nome	Seqüência	Sentido	*Localização
1 POL_F	5' AAACATAGCCGCCACAGAACCC 3'	“sense”	78718
2 POL_R**	5' ACGGCTGCCTCTCATGTTCTA 3'	“antisense”	80443
1 POL_NF**	5' GCTGTCCGTCAAAGATGACACG 3'	“sense”	78897
1 POL_R**	5' GAAGTCCGATGACATTG 3'	“antisense”	79687
2 POL_NF**	5' CCAAAGATCACACCCTCC 3'	“sense”	79559

“Primers” descritos por BALDANTI *et al.*, 1998. * Localização referente à cepa AD169 (ID: X17403). Os “primers” marcados (**) foram utilizados na *n*PCR e também na reação de seqüenciamento.

Seqüenciamento das amostras e identificação de mutações para resistência ao Ganciclovir:

O MegaBACE 1000, é um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia Amersham Biosciences. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase).

A amplificação para seqüenciamento automatizado foi realizada com o DYEnamic™ Terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE™) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA). Para esta reação foi utilizado cerca de 30 ng do produto de PCR purificado, quantificado através de gel de agarose 1,5% utilizando um marcador de massa molecular (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen), 3 µM de iniciador sense e anti-sense (em reações separadas), 4 µl da solução DYEnamic ET Reagent Premix e água deionizada estéril (volume final 15,0 µl). A reação, distribuída em placa própria para seqüenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador (GeneAmp® PCR System 9600 – Applied Biosystems), as amostras foram submetidas a desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos seguido do ciclo:

- Desnaturação: 96°C - 20 segundos
 - Anelamento: 57°C - 15 segundos;
 - Extensão: 60°C - 1 minuto
- } 30 vezes

O produto da reação de seqüenciamento foi precipitado adicionando-se 2,0µl de acetato de amônio 7,5M e 50,0µl de etanol absoluto aos 15,0µl de reação, com posterior homogeneização. Após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão e a seguir foram adicionados 100,0 µl de etanol 70%. Posteriormente o material foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. Novamente o sobrenadante foi desprezado por inversão tomando-se o cuidado de não remover o *pellet*. Para completa remoção do etanol, a placa foi submetida à centrifugação invertida a 200 rpm por 6 segundos e finalmente aquecida em termobloco a 65°C por 5 minutos para a secagem das “wells”. Para a eletroforese, foi adicionado 10,0µl de loading buffer, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0) em cada “well”. As amostras foram homogeneizadas, aquecidas a 65°C por 3 minutos e colocadas em gelo para, a seguir, serem submetidas à eletroforese em seqüenciador automatizado.

O gel para a eletroforese é o MegaBACE Long Read Matrix com poliacrilamida linear (LPAAAs), as condições de eletroforese foram as seguintes: voltagem de injeção da amostra – 3 KV, tempo de injeção da amostra 60 segundos, voltagem de corrida – 9 KV, tempo de corrida 90 minutos, potência do Laser – 40 mW.

Após eletroforese, o Software MegaBACE analisou as seqüências e as amostras foram alinhadas e comparadas à cepa AD169 do HCMV (GI: X17403) através do programa BLAST 2 SEQUENCES (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>).

5- RESULTADOS

5.1- “Nested-PCR” para amplificação do gene da glicoproteína B

Das 169 amostras de DNA extraídas de sangue periférico, 47 apresentaram positividade para a *nPCR* para as regiões MIE e IE do HCMV. Estas amostras foram selecionadas e amplificadas para a região da glicoproteína B para posterior genotipagem (**Figura 4**). As amostras positivas para a *nPCR* estão representadas no Anexo 01.

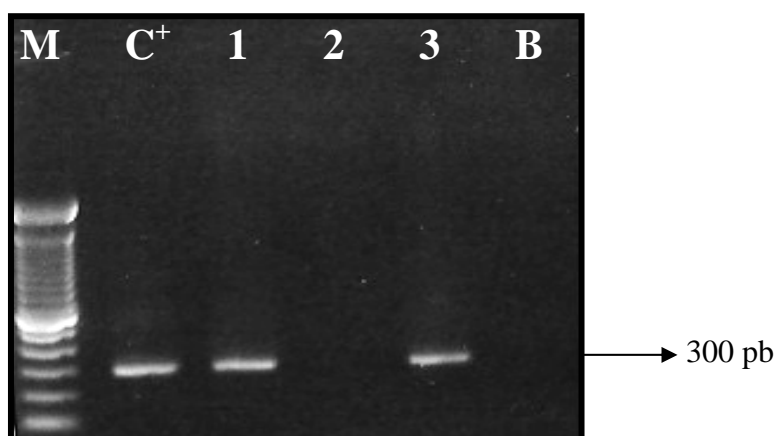


Figura 4- Amplificação de 300 pb do DNA do HCMV com os “primers” gB1319 e gB1604 .

Legenda referente à figura 4:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA);

C⁺ - controle positivo para a reação (cêpa AD169);

1 e 3 - nPCR positivo para gB;

2 - nPCR negativo para gB;

B – branco de reação (H₂O).

A análise de restrição através da PCR-RFLP permitiu identificar padrões eletroforéticos distintos, caracterizando os genótipos virais e estão representados na figura 5:

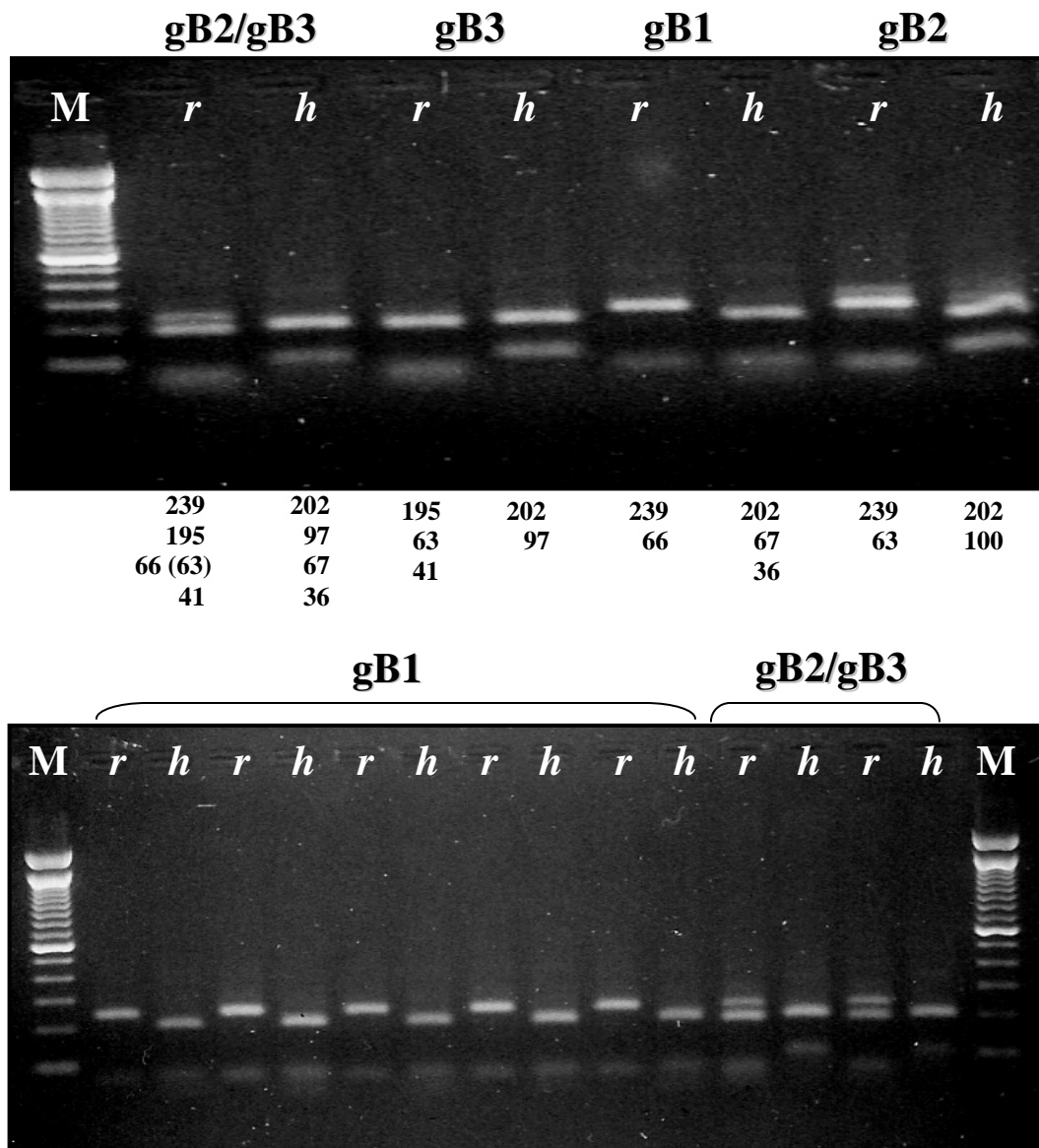


Figura 5- Padrões de digestão (gB) encontrados para as amostras analisadas.

Legenda referente à figura 05:

M – marcador de peso molecular (Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA)

r – padrão de digestão para a enzima *RsaI*;

h – padrão de digestão para a enzima *HinfI*.

Das 47 amostras HCMV-positivas, 42 foram genotipadas e a frequência de distribuição dos subtipos virais está descrita no gráfico 1.

Genotipos	Frequência (%)
gB1	46,8 (22)
gB2	12,8 (6)
gB3	23,4 (11)
gB2/gB3	6,4 (3)
ND	10,6 (5)

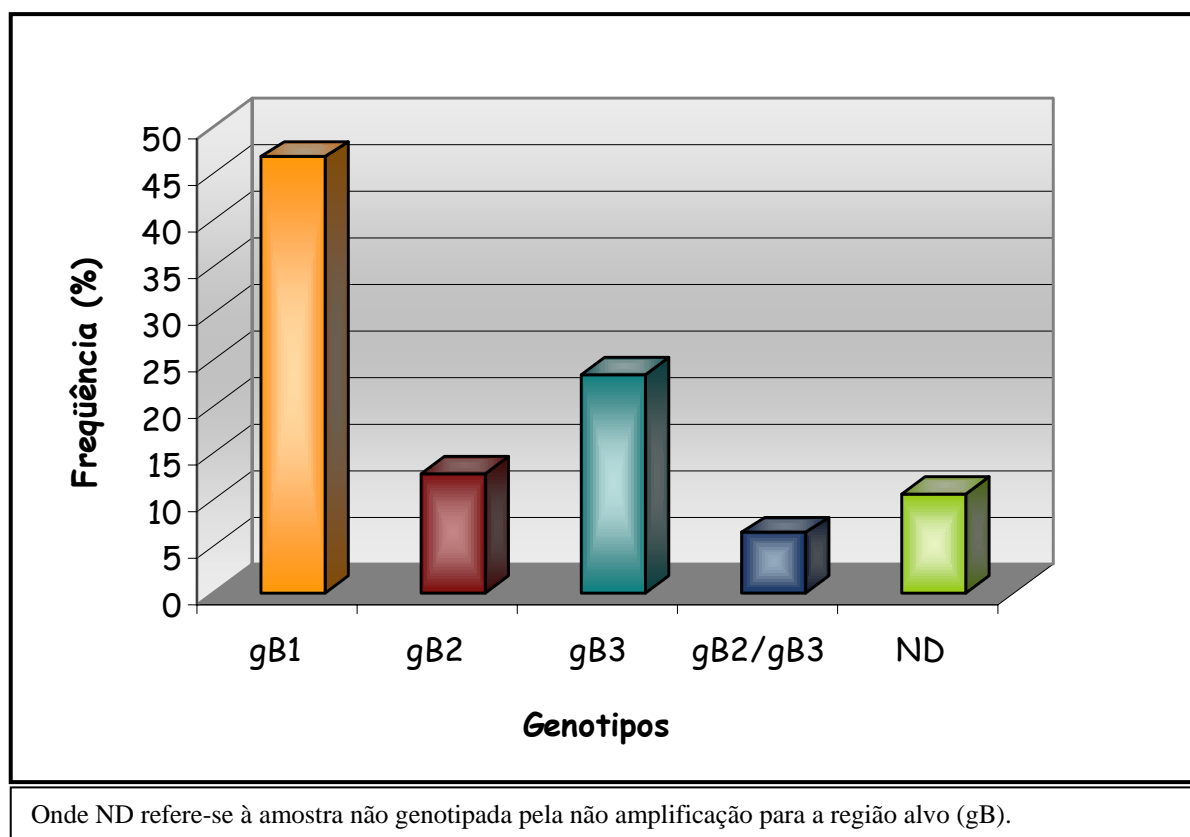


Gráfico 1- Frequência dos genótipos gB entre as amostras HCMV positivas incluídas no estudo.

Levando-se em consideração a distribuição dos genótipos entre os 22 pacientes incluídos no estudo, observamos a frequência descrita no gráfico 2.

Genótipos	Frequência (%)
gB1	31,8 (7)
gB2	18,2 (4)
gB3	13,63 (3)
gB2/gB3	9,1 (2)
ND	13,63 (3)
PCR-	13,63 (3)

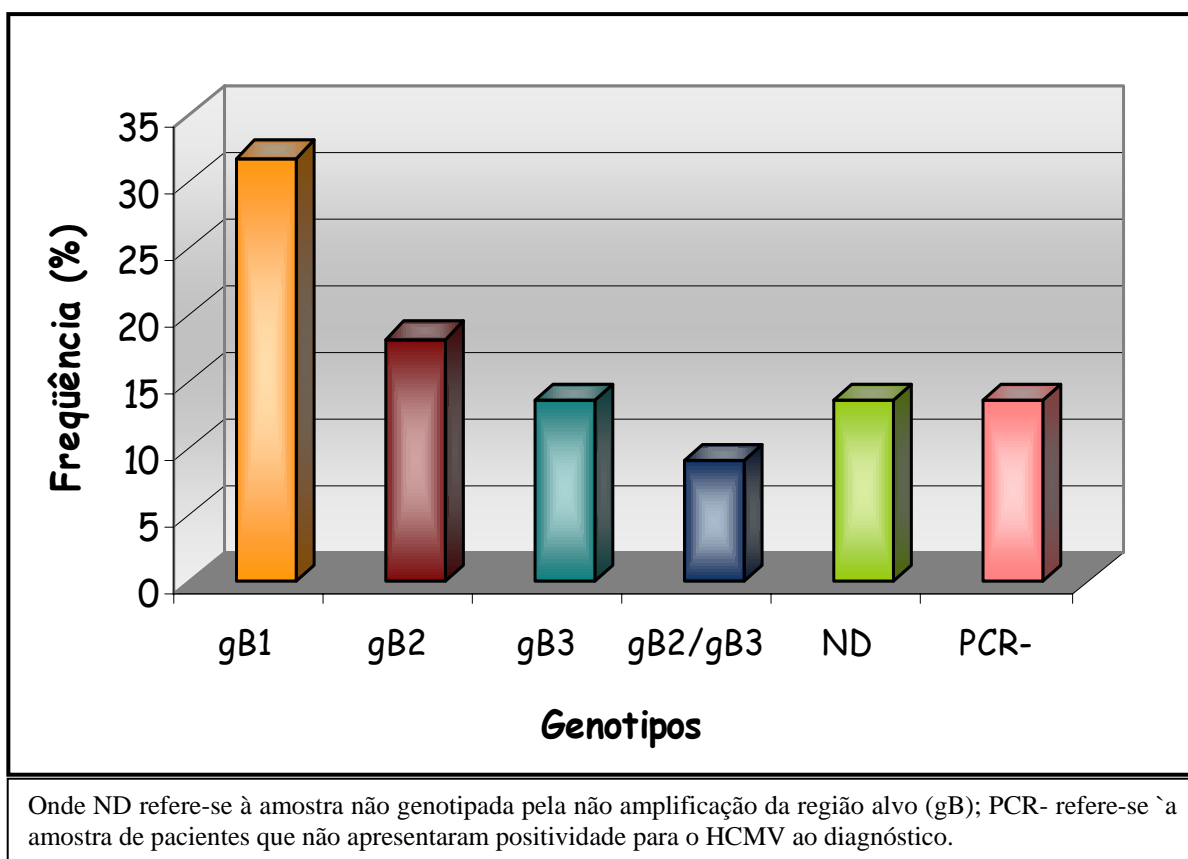


Gráfico 2- Frequência dos genótipos gB entre os pacientes incluídos no estudo.

Para avaliarmos a possível relação entre os genótipos e o quadro clínico apresentado pelo paciente, propusemos uma simbologia das características descritivas da gravidade na apresentação clínica do paciente em relação ao período coletado (**Tabela 8**), cuja sinalização indica maior ou menor gravidade das manifestações clínicas.

Tabela 8- Principais manifestações clínicas observadas nos prontuários dos pacientes.

<i>Gravidade</i>	<i>Quadro Clínico (Prontuários)</i>
+	Esofagite, gastrite, enterocolite, hepatite, pneumonia e retinite - comprovação através de biópsia, citologia, cultura, PCR, antígenemia.
±	Febre, anemia, diarreia, quadro suspeito de infecção por CMV, mas sem comprovação. Melhora pós-tratamento com Ganciclovir, co-infecção com outros patógenos.
–	CMV assintomático no período de coleta da amostra. Apresentação clínica causada por outros patógenos: HIV, HAV, HBV, HCV, HSV, sífilis, pneumonia bacteriana.

A análise dos prontuários foi possível para 18/22 pacientes; 3 pacientes incluídos no estudo não apresentaram positividade para o HCMV ao diagnóstico (região MIE), portanto não genotipados, e 3 pacientes que foram diagnosticados pela *nPCR* como positivos, não amplificaram para a região da glicoproteína B (gB). Sendo assim, os resultados obtidos para 16 pacientes genotipados são observados no gráfico 3.

Gravidade	gB1	gB2	gB3	gB2/gB3
+	1	1	1	0
-	4	1	0	2
±	2	0	1	0
SP		2	1	

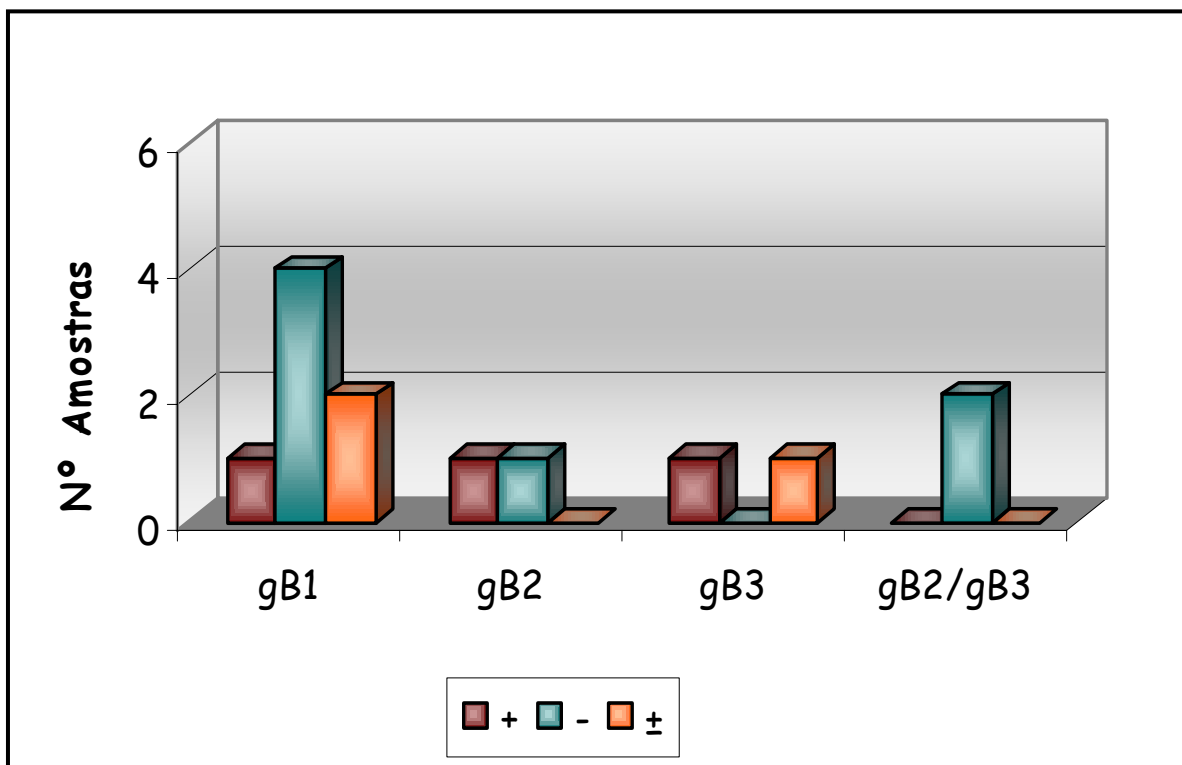


Gráfico 3- Associação genótipo gB de HCMV X apresentação clínica. As amostras sem prontuário (SP) não estão representadas no gráfico.

Os resultados obtidos sugerem que apesar do pequeno número de pacientes avaliados, pode-se perceber que nos pacientes transplantados de medula óssea estudados, os genótipos gB1 e mistura de linhagens gB2/gB3 tendem a se relacionar a melhores prognósticos, enquanto o genótipo gB3 parece estar ligado à quadros clínicos agravados.

5.2- Quantificação da Carga Viral - PCR em Tempo Real

Foram analisadas para a determinação da carga viral 96 amostras de DNA extraído do soro de 12 pacientes transplantados de medula óssea incluídos no estudo (*Anexo I*). Os resultados estão representados nos gráficos a seguir:

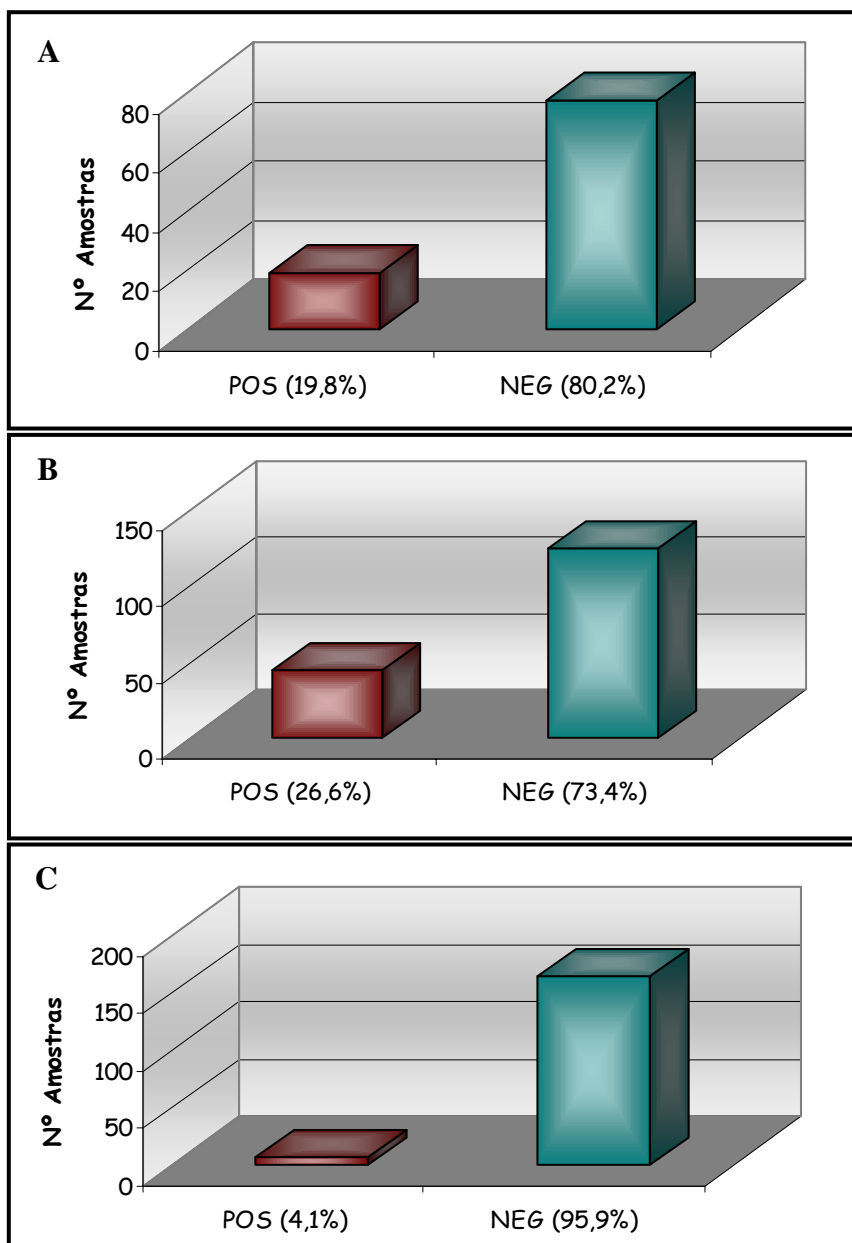


Gráfico 4- Resultados obtidos para as amostras que apresentaram positividade para as metodologias aplicadas: (A) PCR em tempo-real, avaliação de 96 amostras; (B) nPCR em DNA de sangue periférico, avaliação de 169 amostras; (C) nPCR em DNA de soro, avaliação de 171 amostras.

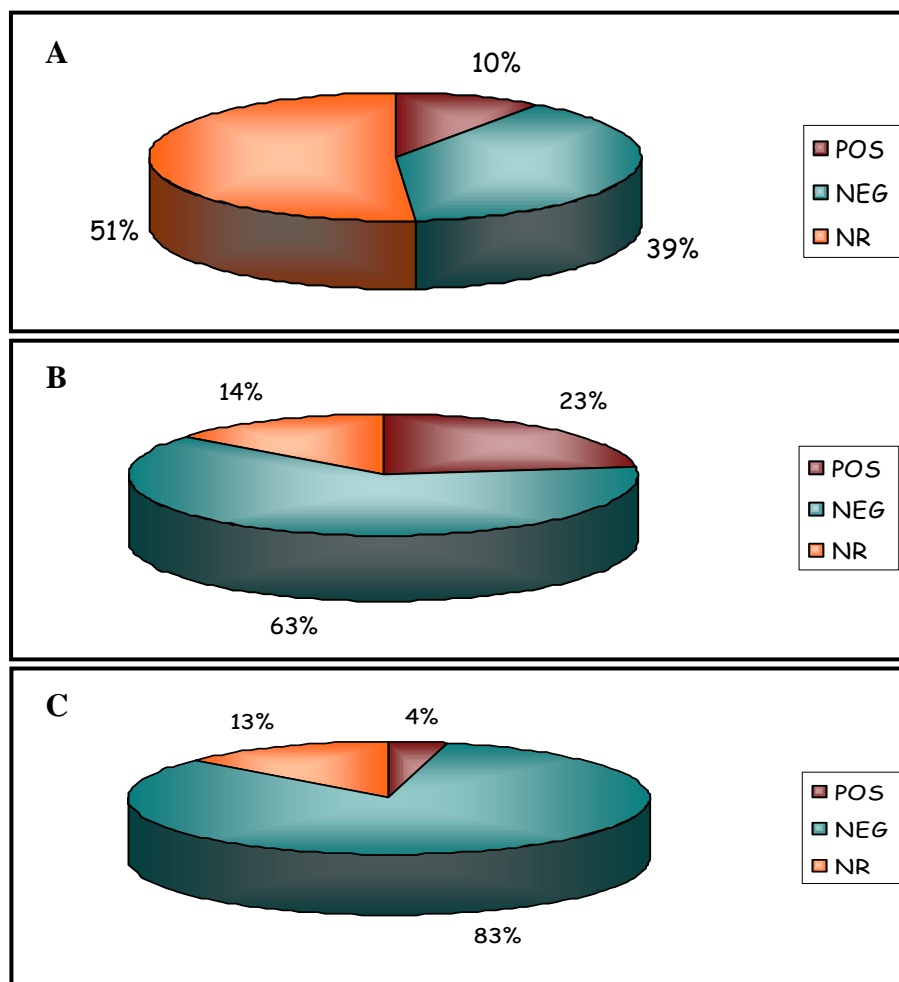


Gráfico 5- Resultados obtidos entre as metodologias aplicadas, levando-se em consideração o número total de amostras – 197 amostras incluídas. **(A)** PCR em tempo-real; **(B)** *n*PCR em DNA de sangue periférico; **(C)** *n*PCR em DNA de soro. Onde NR = Não-Realizada, amostras onde a metodologia aplicada não foi realizada.

RESULTADO	RT-PCR	nPCR - Sangue	nPCR - Soro
POS	19	45	7
NEG	77	124	164
NR	101	28	26
TOTAL	197		

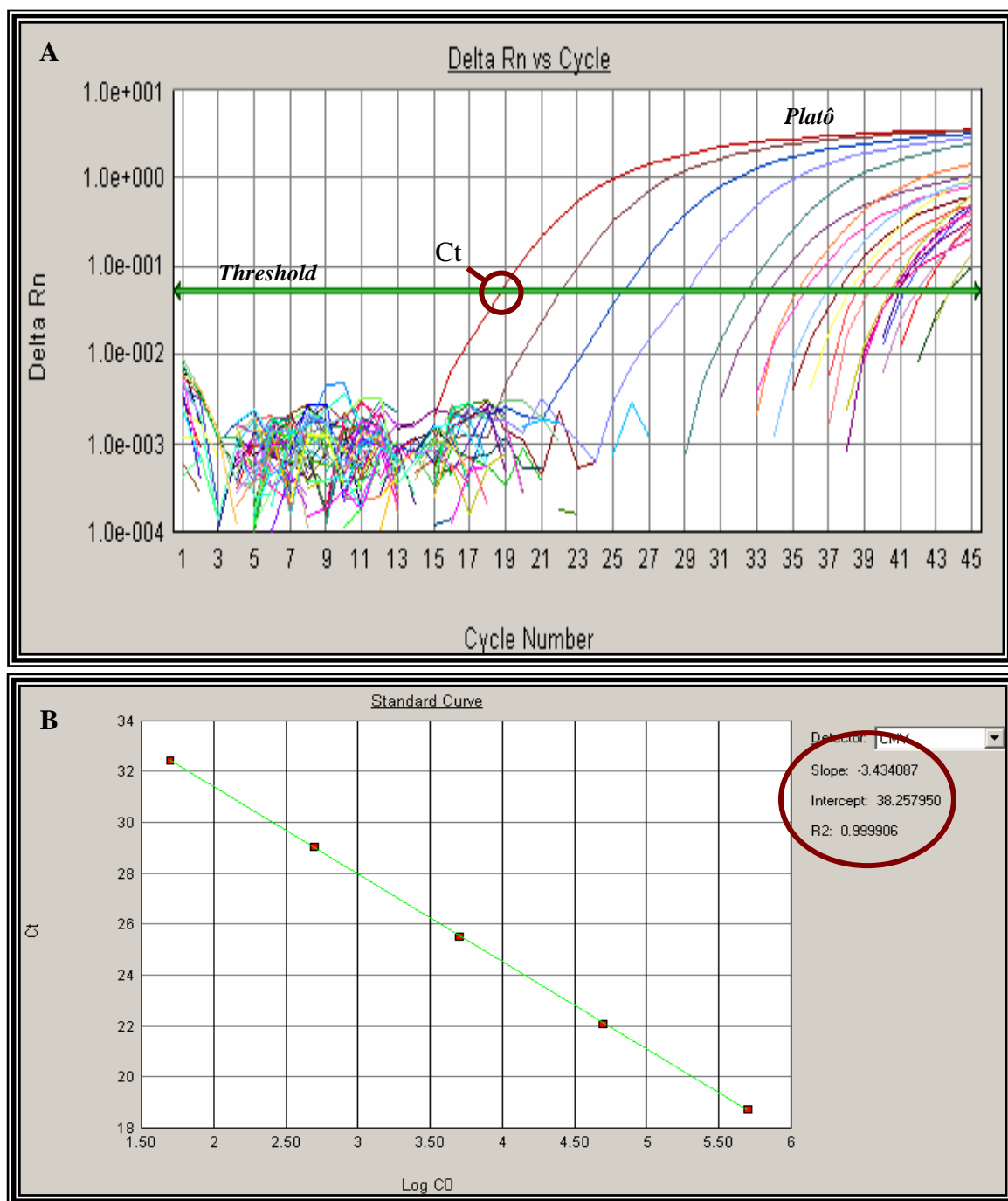
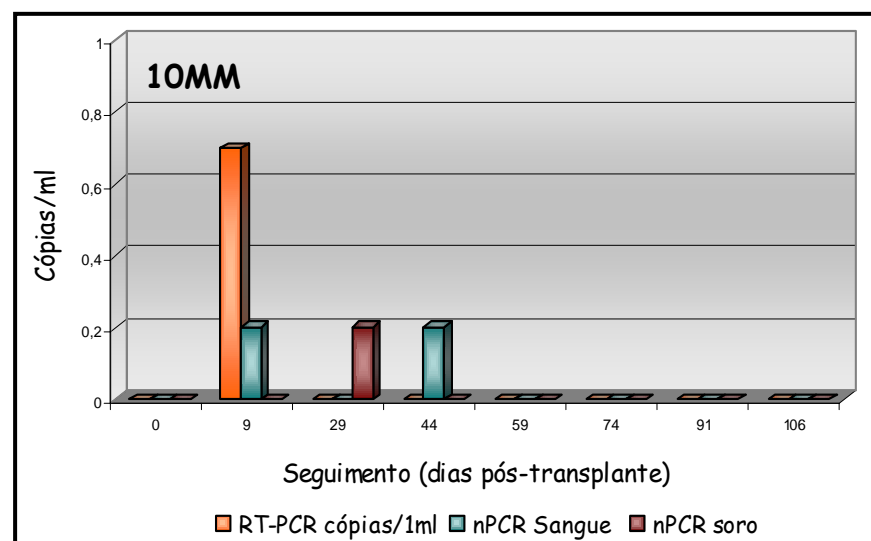
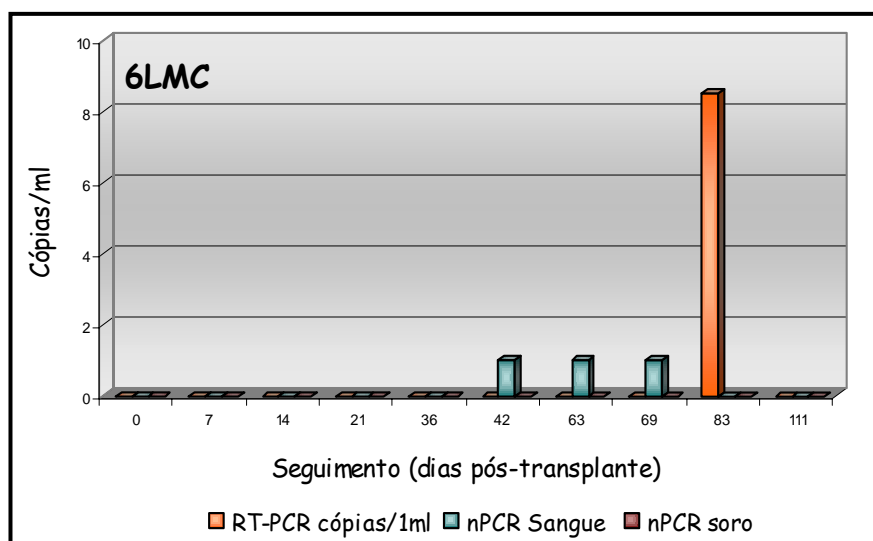
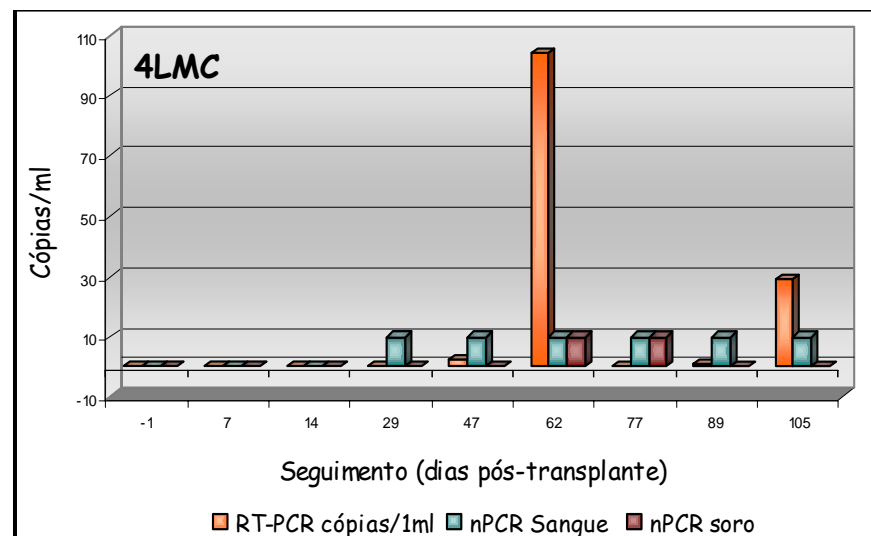
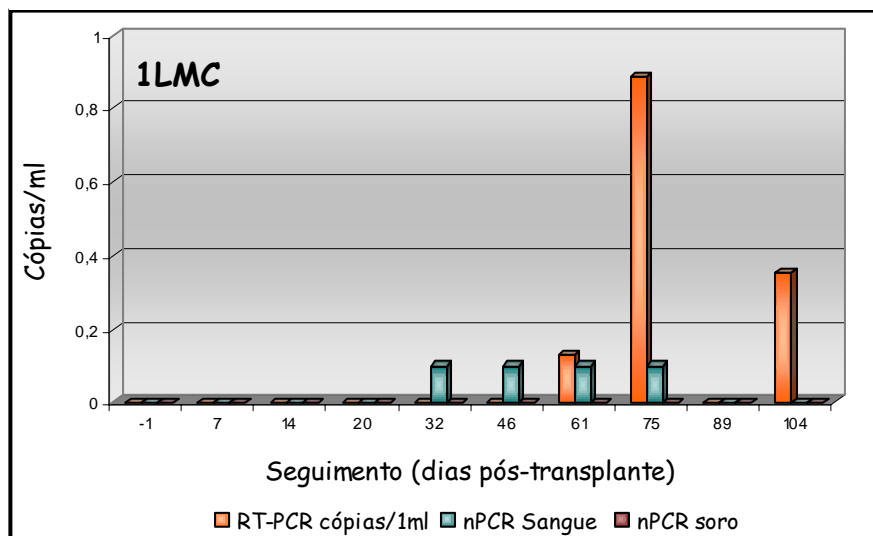
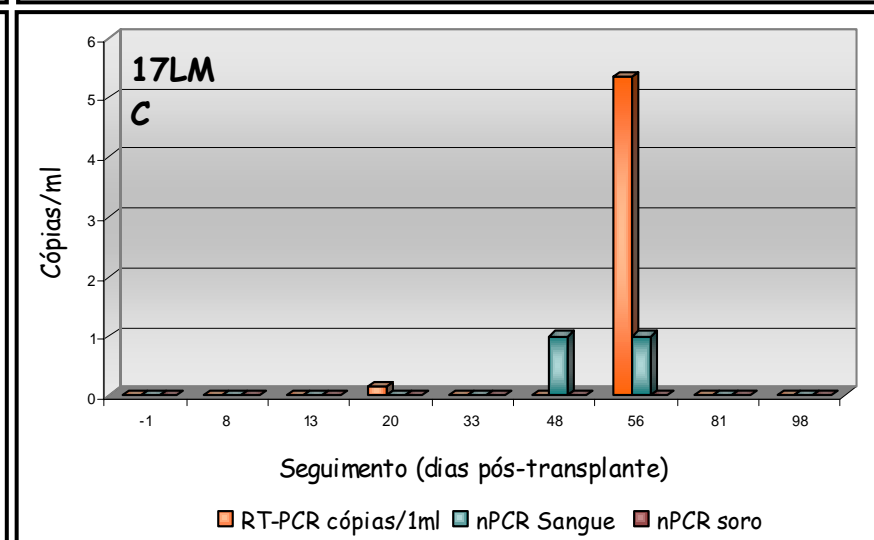
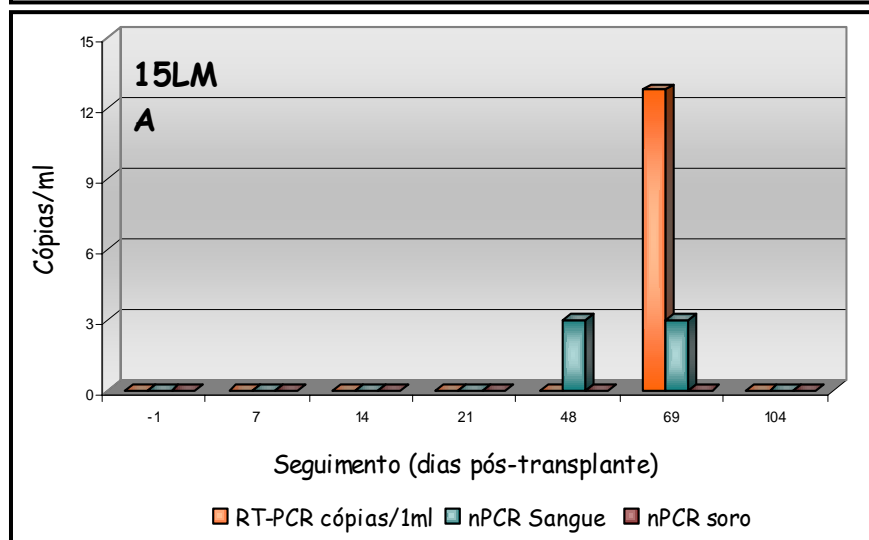
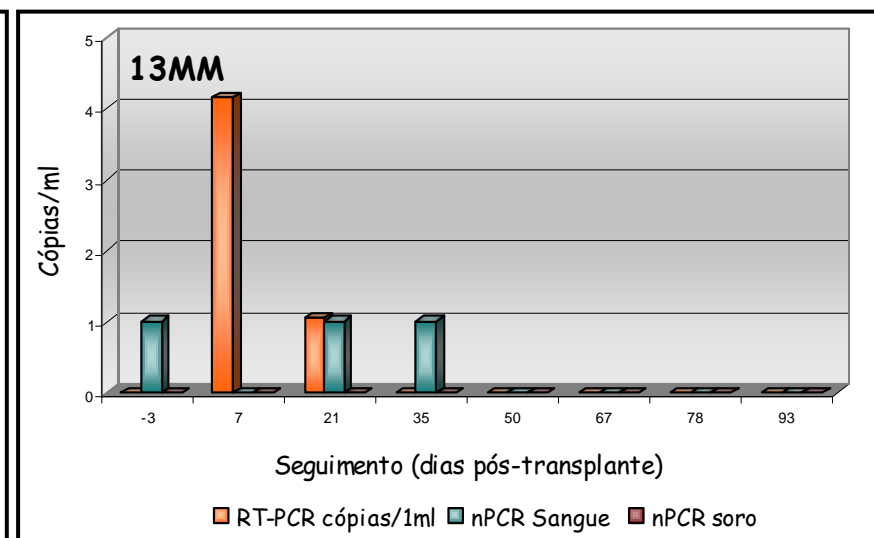
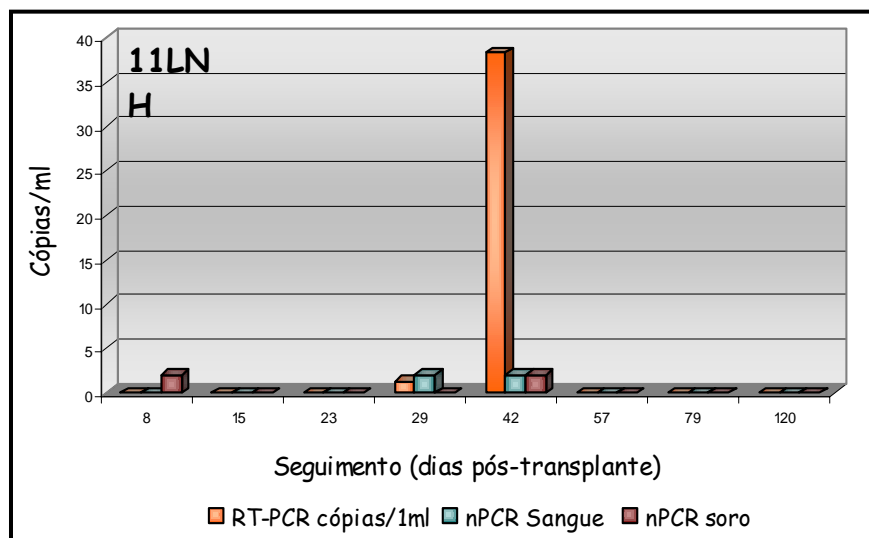


Figura 6- (A) Curva de amplificação das amostras e padrão. (B) Curva padrão e eficiência da reação, dada pela fórmula: $E=10^{-1/\text{slope}}$; 2 = 100% eficiência ; então $E=97,8\%$.; r = linearidade do método; *intercept* = Ct onde detectaríamos uma partícula viral.

Os gráficos a seguir representam o seguimento dos pacientes avaliados pelas técnicas RT-PCR, nPCR sangue e nPCR soro.

Os dois pacientes que não estão representados, não apresentaram resultados positivos em nenhuma das metodologias aplicadas.





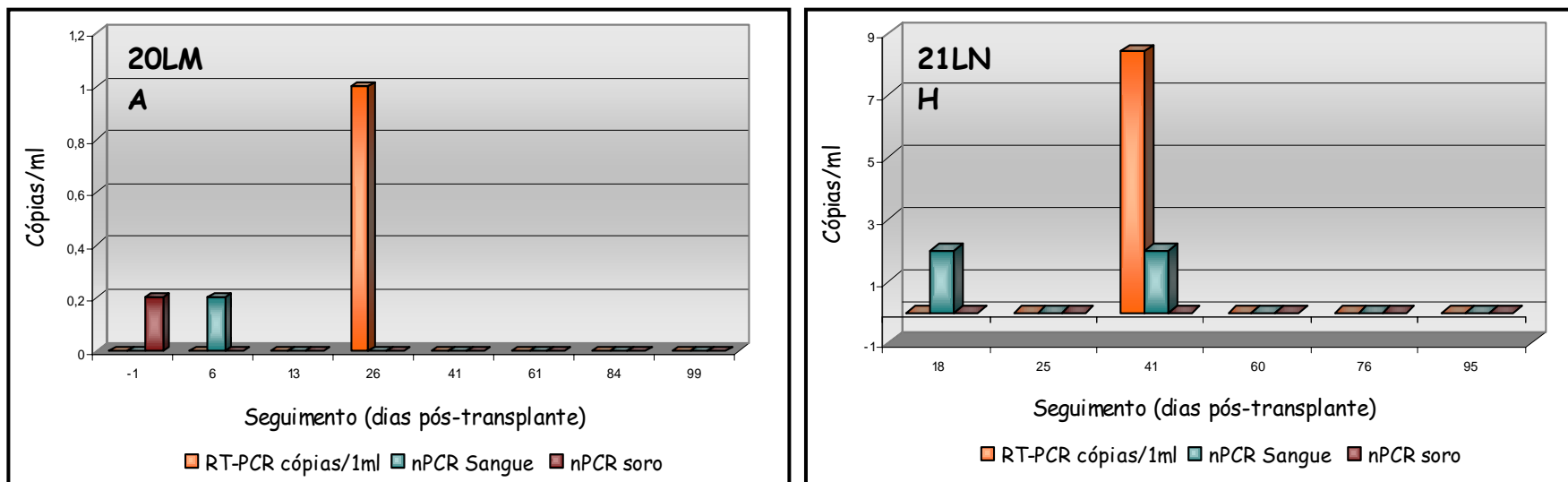


Figura 07- Gráficos representando o seguimento dos pacientes.

Os resultados da RT-PCR são dados em número de cópias virais por ml de amostra inicial (200ml de soro). Para a nPCR sangue e nPCR em soro, os resultados são expresso como positivo e negativo. No entanto, para visualizarmos as três metodologias aplicadas simultaneamente durante o seguimento dos pacientes, adotamos a simbologia 0 para amostras que apresentaram resultados negativos para as nPCRs e um valor, dependendo da escala aplicada ao gráfico, para as amostras positivas.

5.3- Resistência a Agentes Antivirais

- *Gene da Fosfotransferase Viral (UL97)*

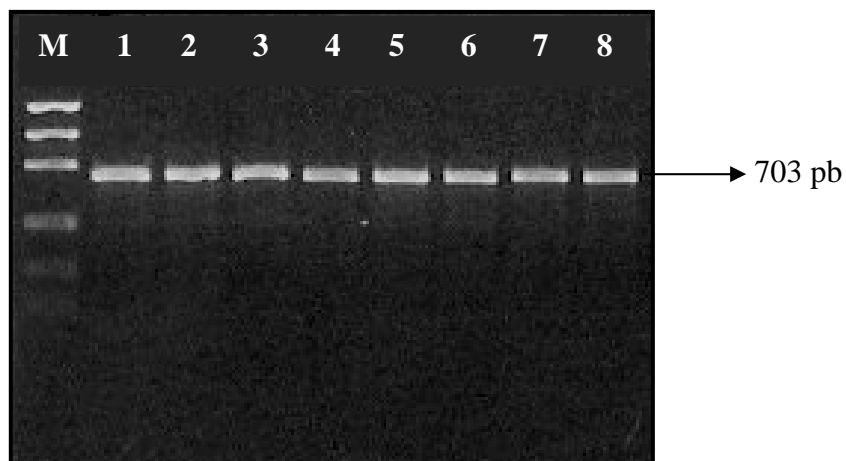


Figura 8- Amplificação de 703 pb do DNA do HCMV com os “primers” 1PHOS F e 3PHOSR (produto da “Nested-PCR”).

Legenda referente à figura 08:

M – marcador de massa molecular (Low DNA Mass Ladder; Invitrogen)

1-8 – Amostras positivas amplificadas para a região polimórfica do gene da fosfotransferase viral, purificadas com o kit GFX (Amersham/GE) para posterior seqüenciamento.

Tabela 9- Distribuição dos polimorfismos (X) e mutações (X) entre os pacientes transplantados de medula óssea, durante seguimento. Alguns pacientes apresentaram polimorfismos entre as diferentes coletas, no entanto não foram observadas mutações que pudessem estar relacionadas com resistência a agentes antivirais. Todos os pacientes receberam Acyclovir profilático. Os pacientes marcados com * receberam tratamento/manutenção com Ganciclovir.

Pacientes	Gravidade	Genótipo	Alterações UL97(aa)	Alterações UL54 (aa)
1LMC	-	gB1	503	318, 594, 657, 663, 996, 1053, 1062, 1131, 1260, 1308, 1329, 1377, 1398, 1464, 1551
4LMC	+	gB3	503, 557, 598, 618	488, 501, 393, 588, 198, 179
5MM	SP	gB2	ND	NA
6LMC	-	gB1	503,553, 579, 598, 634, 456	ND
8LNH*	+	PCR-	PCR-	PCR-
10MM*	SP	ND	503, 557, 598, 618	NA
11LNH	-	gB2/gB3	470, 503, 525, 531, 598, 487, 543, 605	ND
12LNH	SP	gB3	470, 503, 525, 531, 598, 535, 605	435, 443, 419, 401, 365, 140
13MM	-	gB1	503, 553, 579, 583, 598, 634, 496	ND
14AA	-	gB2/gB3	ND	ND
15LMA*	±	gB1	503, 557, 598	NA
17LMC*	±	gB3	503, 557, 598	ND
18LNH	-	N D	ND	ND
19LMC	-	gB1	503, 553, 579, 598, 634	ND
20LMA	-	PCR-	PCR-	PCR-
21LNH	-	gB2	NA	NA
22L	SP	gB2	503, 557, 598, 589	NA
23LNH	±	ND	ND	ND
24LH*	+	gB1	503, 598	365, 419, 420, 459, 488, 517
25LMA*	±	gB1	503, 598, 574	420, 459, 480, 517, 347, 365, 413, 394, 342, 391, 451
26LMA	-	PCR-	PCR-	PCR-
27LMC*	+	gB2	632, 456	517, 515, 488, 459, 447

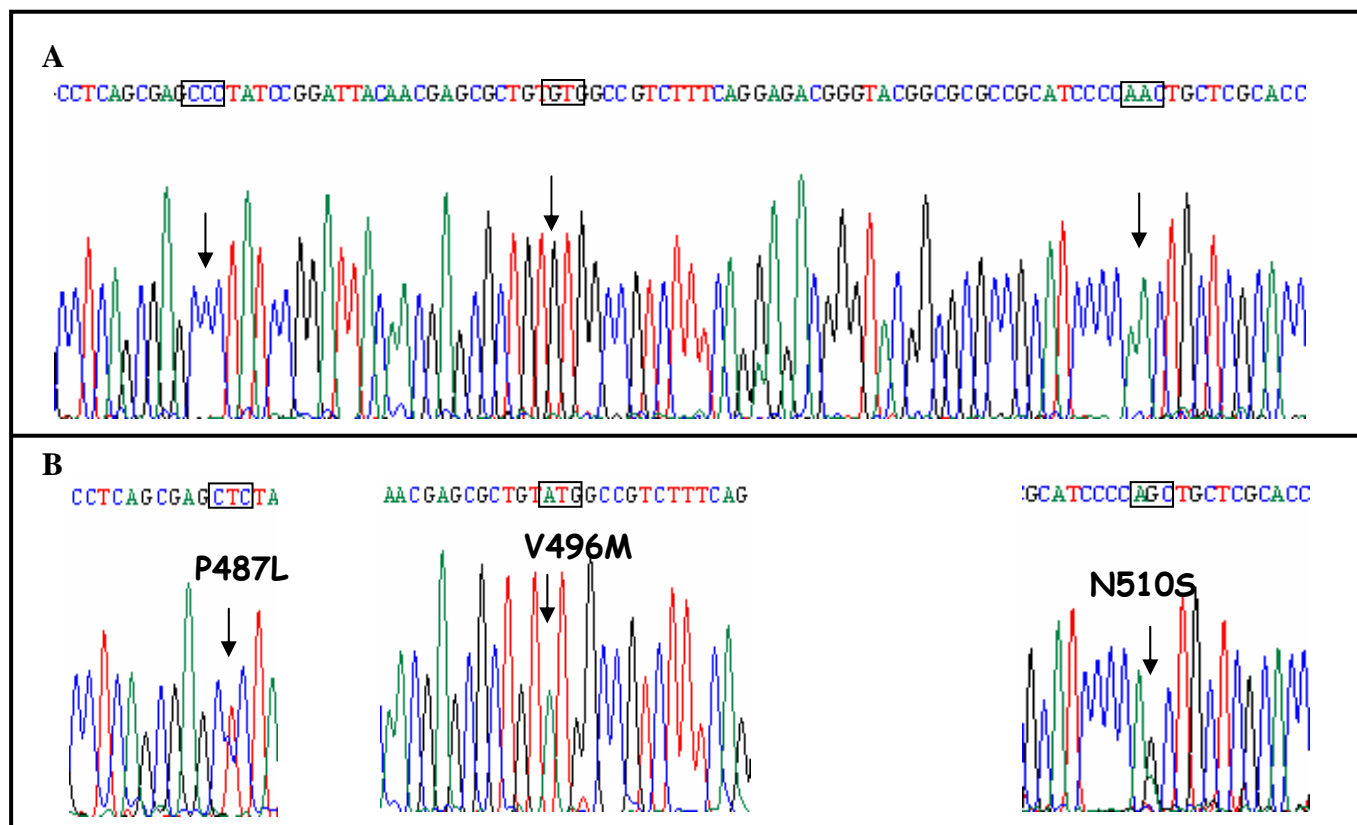


Figura 9- Cromatogramas representando o sequenciamento automatizado para uma região do gene UL97. (A) Sequência laboratorial utilizada como controle positivo na reação (AD169); (B) Representantes das mutações encontradas em nossa casuística.

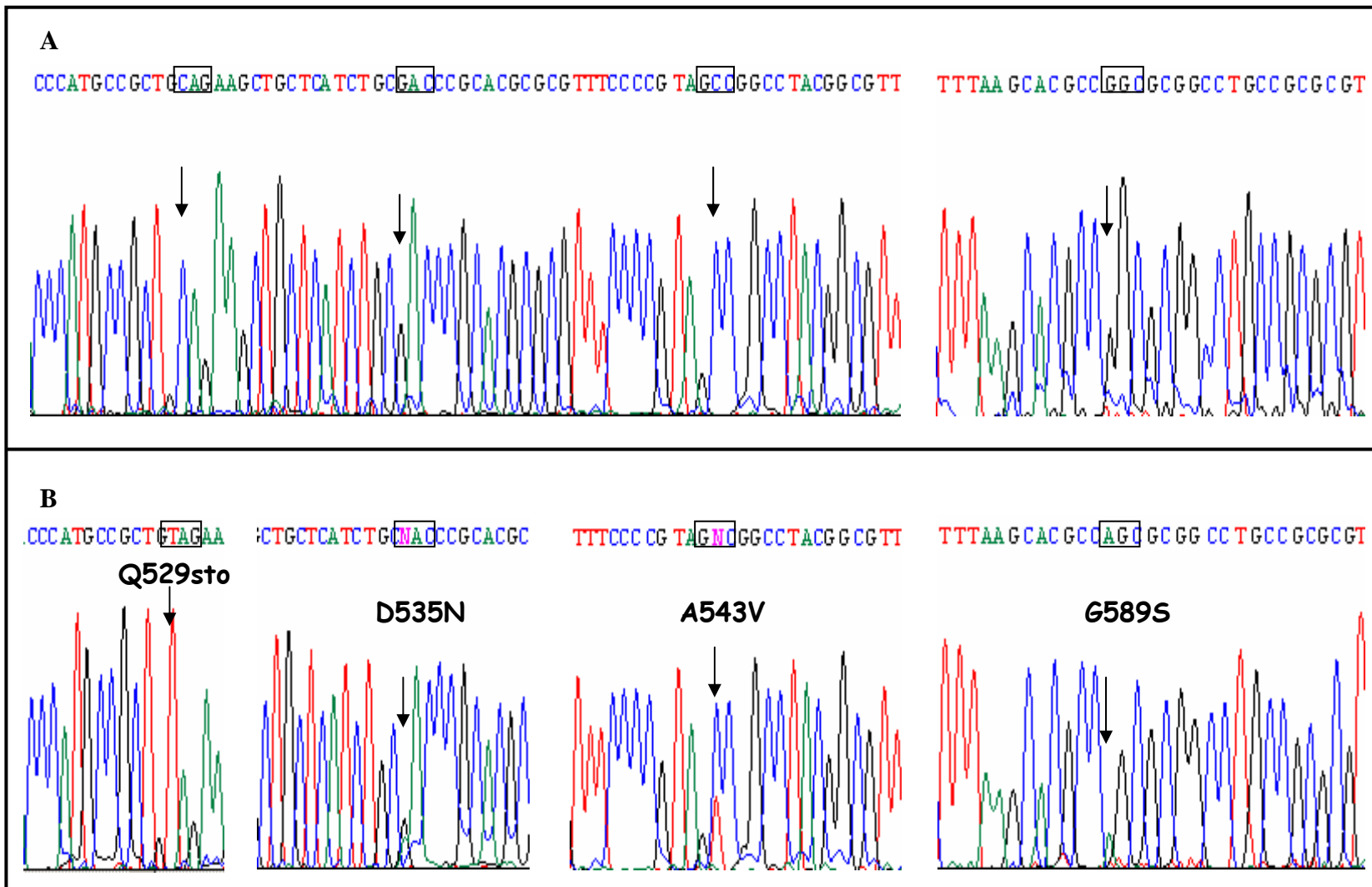


Figura 10- Cromatogramas representando o seqüenciamento automatizado para uma região do gene UL97. **(A)** Seqüência laboratorial utilizada como controle positivo na reação (AD169); **(B)** Representantes das mutações encontradas em nossa casuística.

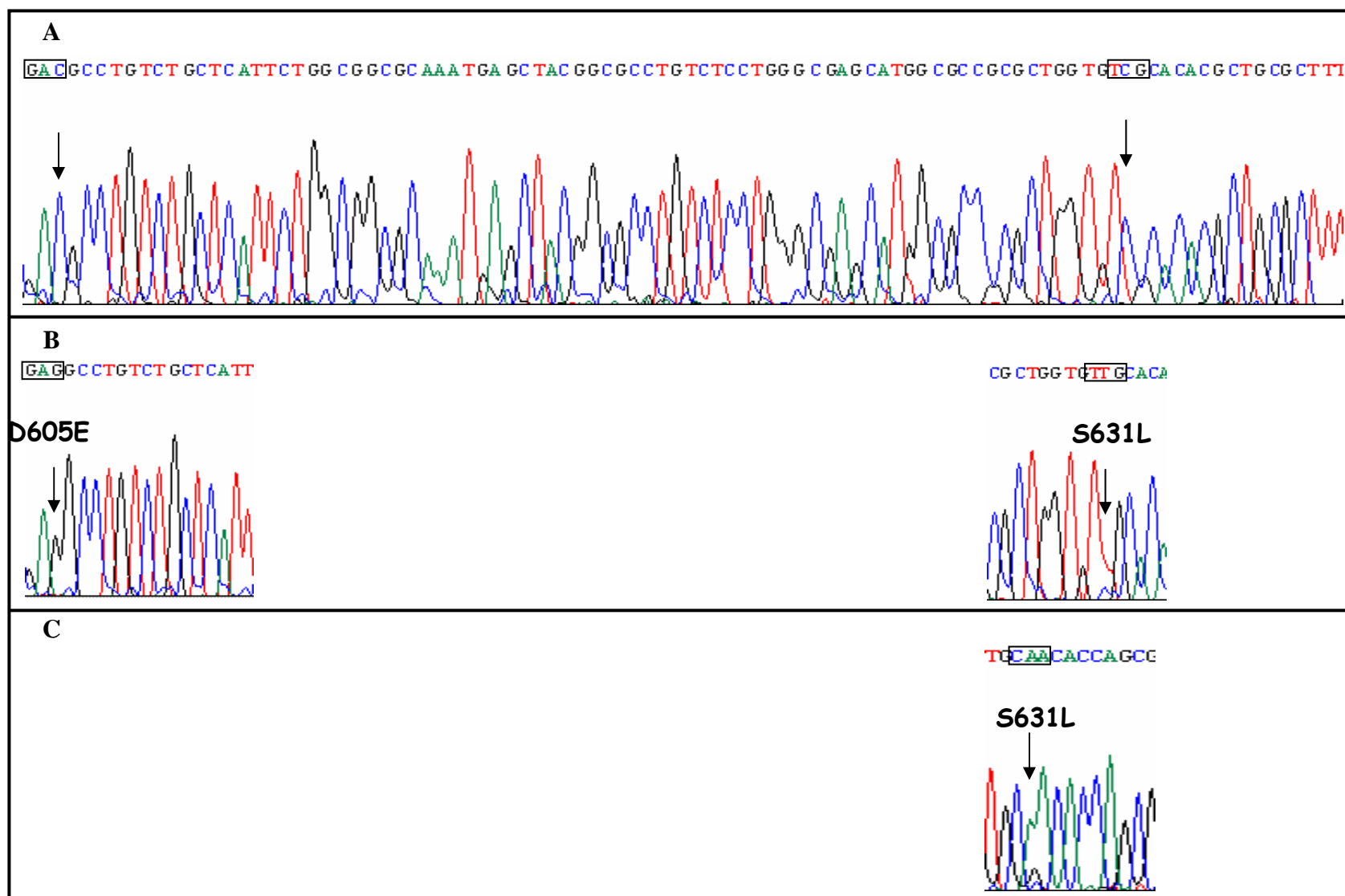


Figura 11- Cromatogramas representando o seqüenciamento automatizado para uma região do gene UL97. **(A)** Seqüência laboratorial utilizada como controle positivo na reação (AD169); **(B)** Representantes das mutações encontradas em nossa casuística; **(C)** Seqüência reversa para a mutação S631L, representado na figura B.

Além das 9 mutações, outros 16 polimorfismos foram identificados para o gene UL97, e estão listados na tabela a seguir:

Tabela 10- Polimorfismos identificados através de seqüenciamento automatizado para o gene UL97 do HCMV:

Posição no Gene	Códon	Alteração	Aminoácido
1368	456	C – T	D
1410	470	C – T	N
1509	503	T – C	G
1527	509	C – T	P
1575	525	C – T	P
1591	531	C – T	L
1657	553	C – T	L
1671	557	T – C	G
1722	574	C – T	D
1737	579	C – T	G
1749	583	G – A	L
1794	598	T – C	G
1809	603	C – T	C
1854	618	C – A	G
1896	632	C – T	H
1902	634	G – A	L

- *Gene da DNA Polimerase Viral (UL54)*

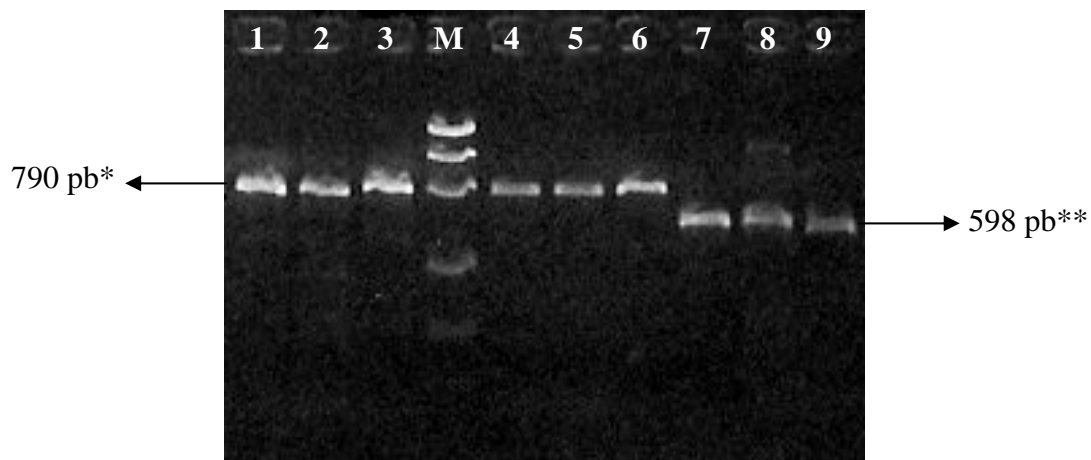


Figura 12- Produto da “Nested-PCR” para 2 regiões do gene da DNA polimerase viral;
 *790 pb do DNA do HCMV com os “primers” 1POLNF e 1POLR, **598 pb do DNA do HCMV com os “primers” 2POLNF e 2POLR.

Legenda referente à figura 12:

***M** – marcador de massa molecular (Low DNA Mass Ladder; Invitrogen)*

***1-6** – Amostras positivas amplificadas para a região polimórfica 1 do gene da DNA polimerase viral, purificadas com o kit GFX (Amersham/GE) para posterior seqüenciamento.*

***7-9** - Amostras positivas amplificadas para a região polimórfica 2 do gene da DNA polimerase viral, purificadas com o kit GFX (Amersham/GE) para posterior seqüenciamento.*

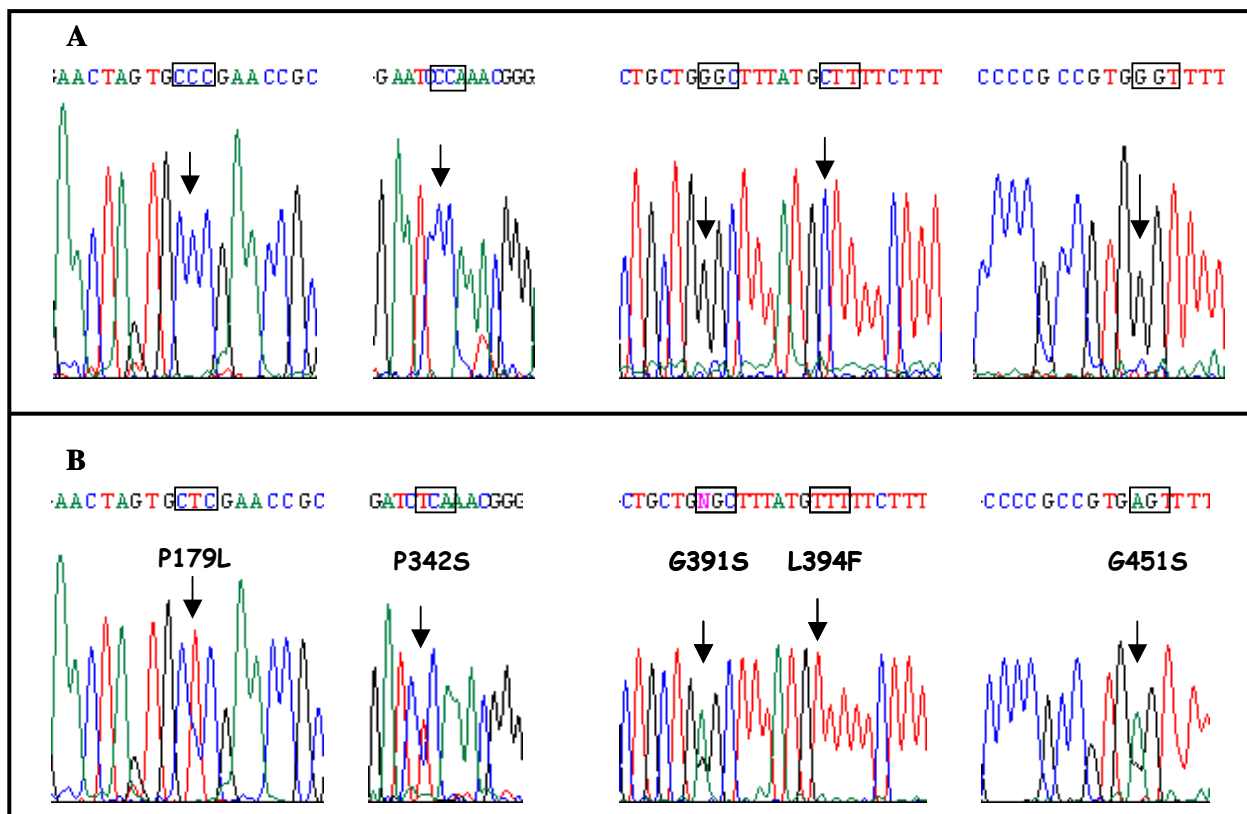


Figura 13- Cromatogramas representando o sequenciamento automatizado para uma região do gene UL54. **(A)** Sequência laboratorial utilizada como controle positivo na reação (AD169); **(B)** Representantes das mutações encontradas em nossa casuística;

Além das 5 mutações, outros 30 polimorfismos foram identificados para o gene da DNA Polimerase viral (UL54):

Tabela 11- Polimorfismos identificados através de sequenciamento automatizado para o gene UL54 do HCMV:

Posição no Gene	Códon	Alteração	Aminoácido
318	106	G – A	Q
393	131	G – A	G
420	140	A – T	T
588	196	C – T	S
594	198	T – C	Y
657	219	C – T	A
663	221	A – G	K
996	332	G – A	G
1041	347	G – A	G
1053	351	T – C	T
1062	354	T _ C	G
1095	365	T – C	F
1131	377	G – A	V
1170	390	G – T	L
1203	401	G – A	P
1239	413	C – T	D
1257	419	G – A	T
1260	420	T – C	R
1305	435	G – A	L
1308	436	T – C	P
1329	443	C _ T	F
1341	447	C – T	S
1377	459	T – C	A
1398	466	C – T	N
1439	480	G – A	G
1464	488	T – C	P
1491	497	C – T	P
1503	501	C – T	L
1545	515	C – T	D
1551	517	T – C	S

6- DISCUSSÃO

O Citomegalovírus humano é um herpesvírus cosmopolita e que geralmente produz infecção persistente e assintomática durante toda a vida. No entanto, em indivíduos que são imunologicamente comprometidos ou que têm um sistema imune imaturo (transplantados, portadores do HIV, pacientes submetidos à quimioterapia, portadores de doença auto-imune e recém-nascidos) o HCMV é o mais freqüente patógeno oportunista, podendo gerar inúmeras manifestações clínicas, que variam desde uma doença com pouca repercussão clínica até uma que envolve risco de vida (DARLINGTON *et al.*, 1991; LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991; NAVARRO *et al.*, 1997).

É um dos mais importantes patógenos que acometem os pacientes transplantados de medula óssea, podendo causar diversas complicações que incluem hepatite, doença gastrointestinal, e pneumonia intersticial (ERICE *et al.* 1998).

Sabe-se que as manifestações clínicas causadas por infecção pelo HCMV podem ser decorrentes da variabilidade genética entre as diferentes linhagens do vírus (LEHNER, STAMMINGER & MACH, 1991). Acredita-se que algumas linhagens têm preferência por infectar determinados órgãos ou tipos celulares, que são mais virulentas ou mais imunossupressoras que outras, ou ainda que têm uma probabilidade maior de contribuir para a rejeição do órgão, em casos de transplante (BINDER *et al.*, 1999). Essas variações ocorrem, geralmente, em regiões gênicas altamente conservadas e funcionalmente relevantes (VOGELBERG *et al.*, 1996; WIGART *et al.*, 1998), além disso, elas têm sido utilizadas como marcadores genéticos em estudos clínicos para se fazer a distinção entre as cêpas e avaliar sua associação com a patogênese viral (RETIÈRE *et al.*, 1998).

As glicoproteínas do envelope dos herpesvírus podem ser alvos para anticorpos de neutralização contra o vírus, controlam a entrada viral e têm papel importante na disseminação do vírus entre as células do hospedeiro (RASMUSSEN *et al.*, 1997). Regiões variáveis, especialmente nas glicoproteínas B (gB) do envelope do HCMV, têm sido extensivamente estudadas, através de técnicas que envolvem biologia molecular, para caracterizar as diferentes linhagens do vírus e sua possível relação com a gravidade de expressão de doença em diversos grupos de pacientes (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994; SHEPP *et al.*, 1998; ROSEN *et al.*, 1998; MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998 e 1998(2); GILBERT *et al.*, 1999; BINDER *et al.*, 1999).

A metodologia geralmente aplicada para a distinção entre os subtipos de CMV é a PCR-RFLP (CHOU, 1990; CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994), que através de um tratamento com endonucleases de restrição, o produto da PCR é clivado em fragmentos de diferentes tamanhos e o perfil da digestão é determinante das linhagens. SHEPP *et al.* (1998) em seus estudos para a mesma região, caracterizaram um quinto genótipo. Recentemente, TRINCADO *et al.* (2000), encontraram em um grupo de crianças com infecção congênita por HCMV, dois novos genótipos virais (gB6 e gB7).

Possivelmente, os genótipos gB tenham sítios de latência diferenciados e reativem em diferentes locais em cada grupo de pacientes, sendo assim, o tipo e a gravidade do defeito imune característico de cada um destes grupos, pode determinar a prevalência dos diversos genótipos do HCMV (BONGARTS *et al.*, 1996).

Diferente do resultado obtido anteriormente em estudo retrospectivo em população transplantada de medula óssea (ALBUQUERQUE & COSTA, 2003), o genótipo gB1 foi o mais freqüente encontrado nesse trabalho (22:47). Embora a correlação do subtipo com a clínica apresentada pelo paciente não tenha sido estatisticamente possível, percebemos uma tendência na correlação do genótipo 3 com apresentação clínica mais grave. Da mesma forma, o genótipo gB1, bem como mistura de cepas parecem estar relacionados a um quadro clínico mais brando.

Os resultados apresentados corroboram os dados da literatura quanto à prevalência do subtipo 1 na população alvo. TOROK-STORB *et al.* (1997) e RASMUSSEN *et al.* (1997), descreveram a predominância do gB1 em um grupo de transplantados de medula óssea, e os dados por eles apresentados sugerem que as linhagens gB3 e gB4 possam estar relacionadas com morte por mielossupressão e menor risco de GVHD aguda de graus II a IV. Outros autores (CHOU & DENNISON, 1991; FRIES *et al.*, 1994) também encontraram na população transplantada de medula óssea estudada por eles, maior freqüência de linhagens de genótipo 1 e relacionaram-na com um melhor prognóstico da infecção. WADA *et al.* (1997), em seus relatos, associaram a prevalência do gB2 com população transplantada de medula óssea de origem oriental e do gB1 em caucasianos. Talvez as diferenças nas freqüências genotípicas possam estar relacionadas à variação na distribuição geográfica dos subtipos.

As propriedades conferidas à glicoproteína B do HCMV, como promover a entrada e disseminação viral nas células hospedeiras, provavelmente explicam as diferenças observadas no tropismo e virulência dos genótipos gB (MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998). Desta forma, as linhagens podem ser diferentes em sua habilidade de regular e interagir com receptores da célula hospedeira relacionados ao processo de adesão e fusão membranar, podendo caracterizar a prevalência de genótipos específicos em determinados grupos de pacientes.

Sendo assim, ROSEN *et al.* (1998) detectaram um número significativamente maior da linhagem gB1 entre os transplantados hepáticos associados com episódios de rejeição aguda, contudo, não houve diferença na gravidade da rejeição ou desenvolvimento de rejeição crônica entre pacientes com genótipos diferentes, conclusões obtidas também por BINDER *et al.* (1999). Estudos avaliando doença por HCMV em receptores de transplante renal também não encontraram correlação entre o genótipo gB e doença associada ao vírus (CHOU & DENNISON, 1991; ROSEN *et al.*, 1998).

SHEPP *et al.* (1996) sugerem em estudo com pacientes portadores da AIDS, forte relação entre viremia e o genótipo gB2 e o desenvolvimento de retinite causada pelo HCMV, mais um indicador de que diferenças na virulência ou tropismo entre as linhagens podem também ter um papel importante na expressão da doença.

A coinfeção com mais de um genótipo do HCMV é um evento não muito raro. Encontramos, em nossa casuística, mistura de linhagens somente entre os genótipos gB2 e gB3, com tendência a relacionar-se com melhor prognóstico clínico. No entanto, COAQUETTE *et al.* (2004), observaram que a infecção com múltiplos genótipos gB em pacientes imunocomprometidos está associada com maior carga viral, alta prevalência de doença por HCMV e alta incidência de rejeição do enxerto; além disso, perceberam que geralmente a presença de múltiplos genótipos gB favorece a infecção com outras viroses. Um estudo com receptores de órgãos sólidos, realizados por HUMAR *et al.* (2003) não comprovou relação entre infecção com múltiplos genótipos gB e doença por HCMV, indicando que o genótipo não influencia significativamente na cinética da carga do HCMV ou resposta clínica à terapia.

Em resumo, a determinação dos genótipos da glicoproteína B (gB) como um marcador prognóstico da infecção por HCMV, permanece controversa. A relação entre o genótipo, desenvolvimento de doença sintomática ou tecido-invasiva e carga viral também não tem sido comprovada. No entanto, a determinação da carga viral pode estar relacionada com a progressão da doença por HCMV e níveis significativos variam dependendo do grupo de pacientes estudados e tipo de amostra analisada.

Muitos autores concordam que a utilização de metodologias de avaliação da carga viral, em pacientes imunocomprometidos, representa um parâmetro valioso para o monitoramento da infecção pelo HCMV e tratamento antiviral (SHIBATA *et al.* 1992; GERNA *et al.* 1995; BAILEY *et al.* 1995; RASMUSSEN *et al.* 1995; ARRIBAS *et al.* 1995; BADLEY *et al.* 1996).

Um método quantitativo que tem sido utilizado para monitorar efetivamente os níveis da infecção pelo HCMV é a antigenemia, numa estratégia preventiva para controlar a infecção. Entretanto, alguns fatores limitam a sua utilização: o processamento da amostra, que deve ser feito em poucas horas pós-coleta e o número requerido de células para o teste (alta prevalência de leucopenia entre os pacientes transplantados de medula óssea).

O procedimento PCR em Tempo Real permite que os pacientes infectados pelo HCMV sejam monitorados mais eficientemente pela quantificação dos produtos da PCR na amostra; é considerado ser superior a qualquer outro método quantitativo de PCR na acurácia, simplicidade, rapidez e reprodutibilidade.

Aplicamos a RT-PCR para o monitoramento da infecção por HCMV em 96 amostras, de DNA extraídos de soro, de 12 pacientes transplantados de medula óssea seguidos até o dia 100 pós-transplante.

Cerca de 20% (19:96) das amostras avaliadas tiveram a RT-PCR positiva e o número de cópias virais detectados foi de 0,1 – 100 cópias/ml. De acordo com LI *et al.*, 2003, o valor de corte para limiar de tratamento para pacientes com baixo, intermediário e alto risco para desenvolvimento de doença por HCMV, é de 1000, 4000 e 10000 cópias/ml, correspondendo aos valores de 1-2, 10 e 50 células positivas por 2×10^5 leucócitos, respectivamente.

A baixa carga viral detectada em nossa casuística pode estar relacionada ao tratamento profilático dos pacientes com Acyclovir e também à instituição da terapia com Ganciclovir precoce. O resultado positivo para a RT-PCR para HCMV não necessariamente indica um risco real de desenvolvimento de doença por HCMV, e estes resultados são geralmente superestimados. Sabe-se que a RT-PCR em DNA extraído de leucócitos, fornece resultados compatíveis com a Antigenemia, no entanto, se conseguirmos definir um valor de corte preditivo para doença por HCMV em amostras de DNA extraídos do soro através da RT-PCR, estabeleceremos uma metodologia adequada para a utilização principalmente para monitoramento da adequação do tratamento, do tratamento antiviral e como preditor de doença.

Dessa forma, o monitoramento desta terapia implica não somente na análise da carga viral e de outros índices da expressão viral, mas também a introdução de testes de sensibilidade às drogas. A avaliação dos níveis de viremia sozinha não parece ser suficiente para fornecer dados completos para informação sobre a eficiência do tratamento.

Análises genótípicas e fenótípicas podem indicar que o paciente foi infectado com a mesma linhagem Ganciclovir-resistente no sangue, urina, e fluido cerebrospinal; essa linhagem pode ser associada a um aumento no nível de DNA de HCMV no plasma, e tanto o surgimento de linhagem resistente quanto o aumento nos níveis de DNA no plasma, precedem o desenvolvimento de doença relacionada ao HCMV.

Sequenciamento automatizado, considerado padrão-ouro para detecção de mutações relacionadas à Resistência antiviral, foi utilizado nas amostras que confirmaram diagnóstico positivo e posterior amplificação dos genes UL97 e UL54. A resistência antiviral tem sido apresentada como resultado de alterações em duas enzimas codificadas pelo vírus, a DNA Polimerase viral (UL54) e a Fosfotransferase (UL97), e ocorrem após períodos prolongados de terapia com Ganciclovir (3 meses de terapia cumulativa).

Para o Gene UL97, as mutações relacionadas com resistência ao Ganciclovir estão localizadas nas regiões que englobam os códons 590 – 607, 466 e 521. Para o Gene UL54, as mutações associadas com resistência a drogas estão localizadas nos códons 304, 393, 406, 512, 691, 737, 751, 830, 834, 841, 961 e 972.

Identificamos 9 mutações e 16 polimorfismos para o gene da fosfotransferase (UL97). Apenas uma das mutações encontradas (D605E) foi descrita anteriormente (CHOU, 1999; LURAIN, 2002) e está relacionada à sensibilidade ao Ganciclovir. Esta variante foi identificada em seis amostras de dois pacientes que apresentaram clínicas favoráveis. As outras mutações estão localizadas entre os códons 487 e 589. Com exceção da variante G589S, que está próxima à uma região onde há várias mutações relacionadas à resistência ao Ganciclovir, as demais estão em regiões onde não há descrição de mutações.

Dentre os polimorfismos, dois foram descritos anteriormente (KOTTARIDI *et al.*, 2003): 579 (C-T) que codifica uma Glicina, e que apareceu em 3 dos 14 pacientes, e o outro, 598 (T-C) que também codifica uma Glicina, apareceu em 12 dos 14 pacientes. O paciente 11 LNH, cujo genótipo gB é gB2/gB3, além da mutação D605E, possui outras 2 variantes: P487L e A543V, e de acordo com o prontuário, a clínica apresentada durante o seguimento foi considerada leve. Os polimorfismos UL97 localizados nos aminoácidos 553, 579 e 634, parecem estar relacionados ao genótipo gB1; os demais não demonstraram um padrão de distribuição entre os genótipos.

Para o gene da DNA Polimerase Viral (UL54), cinco mutações foram pela primeira vez identificadas, 4 delas no paciente 25LMA: P342S, G391S, L394F, G451S. Estas mutações estão localizadas na região IV do gene UL54 e são frequentemente associadas com resistência ao Ganciclovir. Além de ter recebido Acyclovir profilático, este paciente recebeu tratamento por 7 dias com Ganciclovir, além de manutenção, por apresentar, durante seguimento, dois *n*PCRs positivos para HCMV. O prontuário não refere agravamento do quadro clínico e nem suspeita de doença por HCMV.

A outra mutação é a P179L, presente na amostra do paciente 4LMC que apresentou genótipo gB3. Está localizada próxima à região *ExoI* no gene UL54 e não há relatos de ser relacionada à resistência. No entanto, além de 4 polimorfismos no gene UL97 e 5 no gene UL54, a mutação é a única variante que pode estar relacionada à resistência ao Ganciclovir. O prontuário não foi localizado, mas sabe-se que o paciente foi a óbito por HCMV disseminado.

Quanto aos polimorfismos, 30 variantes foram identificadas do códon 106 ao códon 517, compreendendo as regiões IV e δ -region C do gene UL54; não há relatos sobre elas e também não seguem um padrão de distribuição entre os genótipos.

7- CONCLUSÕES

- 1- Determinou-se a prevalência do genótipo gB1 de HCMV em transplantados de medula óssea em seguimento no Hemocentro – UNICAMP, e embora sem comprovações estatísticas, percebeu-se a relação do genótipo com melhor prognóstico;
- 2- Ainda com relação a genotipagem, observou-se, através dos prontuários dos pacientes, que o genótipo gB3 pode estar relacionado com pior prognóstico;
- 3- A RT-PCR no soro é um método adequado para avaliação da carga viral em pacientes transplantados de medula óssea. É preciso, simples, rápido e reprodutivo. No entanto, para ser utilizado no monitoramento destes pacientes, em relação ao tratamento antiviral, e como preditor de doença pelo HCMV, é necessário que se defina um valor de corte;
- 4- A RT-PCR no soro, apesar da baixa viremia, mostrou-se mais sensível que a *n*PCR no soro;
- 5- Identificaram-se 8 novas mutações para o gene da Fosfotransferase (UL97) do HCMV e 14 polimorfismos não relatados anteriormente. Uma das mutações identificadas pode estar relacionada à resistência ao Ganciclovir por estar numa região gênica favorável;
- 6- Três polimorfismos no gene UL97, observados com maior frequência, podem estar relacionados ao genótipo gB1. São eles: 553 – Lisina (C-T), 579 – Glicina (C-T) e 634 Lisina (G-A), podendo se tornar marcadores para subtipo viral;
- 7- Para o gene da DNA Polimerase Viral (UL54), identificaram-se 5 mutações nunca antes descritas, localizadas na região IV do gene e que normalmente está associada com resistência ao Ganciclovir, sendo 4 em um único paciente. Além disso, foram identificados 30 polimorfismos não relatados anteriormente;

A determinação da carga viral é importante, mas não é o único modo de se avaliar a eficiência do tratamento. A avaliação de outros parâmetros moleculares como a genotipagem, que permanece controversa na literatura, e prováveis genes e mutações relacionadas à resistência do HCMV ao agente antiviral, são informações complementares e que deverão ser levadas em consideração no monitoramento dos pacientes transplantados de medula óssea.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBEROLA, J.; DOMÍNGUEZ, V.; CARDEÑOSO, L.; LÓPEZ-ALDEGUER, J.; BLANES, M.; ESTELLÉS, F.; RICART, C.; PASTOR, A.; IGUAL, R.; NAVARRO, D. – Antibody Response to Human Cytomegalovirus (HCMV) Glycoprotein B (gB) in AIDS Patients with HCMV End-Organ Disease. *Journal of Medical Virology*, **55**: 272-280, 1998.

ALBUQUERQUE, D.M.; COSTA, S.C.B. – Genotyping of Human Cytomegalovirus using Non-Radioactive Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. *Journal of Virological Methods*, **110**: 25-28, 2003.

ALFORD, C.A.; BRITT, W.J. - Cytomegalovirus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. - *Virology*, 2^a ed., New York, Raven Press Ltda, 1990, p. 1981-2010.

AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.M – High Prevalence of Renal Transplant Recipients Infected with More Than One Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype. *Journal of Medical Virology*, **61(1)**: 138-142, 2000.

ARRIBAS, J.R.; CLIFFORD, D.B.; FICHTENBAUM, C.J.; COMMINS, D.L.; POWDERLY, W.G.; STORCH, G.A. – Level of Cytomegalovirus (CMV) DNA in Cerebrospinal Fluid of Subjects with AIDS and CMV Infection of the Central Nervous System. *Journal of Infection Diseases*, **172**: 527-531, 1995.

AUGUSTYNOWICZ, E.; DZIERZANOWSKA, D. – Molecular Analysis of the Human Cytomegalovirus Strains Isolated from Infected Infants. *Acta Microbiologica Polonica*, **47(4)**: 373-383, 1998.

BADLEY, A.D.; PATEL, R.; PORTELA, D.F.; HARMSSEN, W.S.; SMITH, T.F.; ILSTRUP, D.M.; STEERS, J.L.; WIESNWR, R.H.; PAYA, C.V. – Prognostic Significance and Risk Factors of Untreated Cytomegalovirus Viremia in Liver Transplant Recipients. *Journal of Infection Diseases*, **173**: 446-449, 1996.

BAILEY, T.C.; BULLER, R.S.; ETTINGER, N.A.; TRULOCK, E.P.; GAUDREAULT-KEENER, M.; LANGLOIS, T.M.; FORNOFF, J.E.R.; COOPER, J.D.; STORCH, G.A.- Quantitative Analysis of Cytomegalovirus Viremia in Lung Transplant Recipients. *Journal of Infection Diseases*, **171**: 1006- 1010, 1995.

BALDANTI, F.; SIMONCINI, L.; SARASINI, A.; ZAVATTONI, M.; GROSSI, P.; REVELLO, M.G.; GERNA, G. - Ganciclovir Resistance as a Result of Oral Ganciclovir in a Heart Transplant Recipient with Multiple Human Cytomegalovirus Strains in Blood. *Transplantation*, **66**: 324-329, 1998.

BALDANTI, F.; MICHEL, D.; SIMONCINI, L.; HEUSCHMID, M.; ZIMMERMANN, A.; MINISINI, R.; SCHAARSCHMIDT, P.; SCHMID, T.; GERNA, G.; MERTENS, T. – Mutations in the UL97 ORF of Ganciclovir-Resistant Clinical Cytomegalovirus Isolates Differentially Affect GCV Phosphorylation as Determined in a Recombinant Vaccinia Virus System. *Antiviral Research*, **54**: 59-67, 2002.

BINDER, T.; SIEGERT, W.; KRUSE, A.; OETTL, H.; WILBORN, F.; PENG, R.; TIMM, H.; NEUHAUS, P.; SCHMIDT, C.A. – Identification of Human Cytomegalovirus Variants by Analysis of Single Strand Conformation Polymorphism and DNA Sequencing of the Envelope Glycoprotein B Gene Region-Distribution Frequency in Liver Transplant Recipients. *Journal of Virological Methods*, **78(1-2)**: 153-162, 1999.

BOECKH, M.; BOIVIN, G. – Quantitation of Cytomegalovirus: Methodologic Aspects and Clinical Applications. *Clinical Microbiology Reviews*, **11(3)**: 533-554, 1998.

BOIVIN, G. – Reply to the Editor: Polymerase Chain Reaction (PCR) from Ficoll-Purified Polymorphonuclear Leukocytes for Allograft Recipients: Superior Sensitivity and Similar Specificity Compared with Plasma PCR. *Journal of Infectious Diseases*, **178**: 1545, 1998.

BOIVIN, G.; GILBERT, C.; MORISSETTE, M.; HANDFIELD, J.; GOYETTE, N.; BERGERON, M.G. - A Case of Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus (CMV) Retinitis in a Patient with AIDS: Longitudinal Molecular Analysis of the CMV Viral Load and Viral Mutations in Blood Compartments. *AIDS*, **11**: 867-873, 1997.

BONGARTS, A.; von LAER, D.; VOGELBERG, C.; EBERT, K.; van LUNZEN, J.; GARWEG, J.; VAITH, P.; HUFERT, F.; HALLER, O.; MEYER-KÖNIG, U. – Glycoprotein B Genotype of Human Cytomegalovirus: Distribution in HIV-Infected Patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **28**: 447-449, 1996.

- BOWEN, E.F.; EMERY, V.C.; WILSON, P.; JOHNSON, M.A.; DAVEY, C.C.; SABIN, C.A.; FARMER, D.; GRIFFITHS, P.D. - Cytomegalovirus Polymerase Chain Reaction Viraemia in Patients Receiving Ganciclovir Maintenance Therapy for Retinitis. *AIDS*, **12**: 605-611, 1998.
- BRAINARD, J. A.; GREENSON, J.K.; VESY, C.J.; TESI, R.J.; PAPP, A.C.; SNYDER, P.J.; WESTERN, L.; PRIOR, T.W. - Detection of Cytomegalovirus in Liver Transplant Biopsies. *Transplantation*, **57**: 1753-1757, 1994.
- BRESNAHAN, W.A.; SHENK, T. - A Subset of Viral Transcripts Packaged Within Human Cytomegalovirus Particles. *Science*, **288**: 2373-2376, 2000.
- BRITT, W. J.; MACH, M. - Human Cytomegalovirus Glycoproteins. *Intervirology*, **39**: 401-412, 1996.
- BROWN, H.L.; ABERNATHY, M.P. - Cytomegalovirus Infection. *Seminars in Perinatology*, **22(4)**: 260-266, 1998.
- BRUGGEMAN, C.A. - Cytomegalovirus and Latency: an overview. *Virchows Archiv B: Cell Pathology*, 325-333, 1993.
- BRUGGEMAN, C.A.; MARJORIE, H.J.; NELISSEN-VRANCKEN, G. - Cytomegalovirus and Atherogenesis. *Antiviral Research*, **43**: 135-144, 1999.
- BRYTTING, M.; SUNDQVIST, V.A.; STALHANDSKE, P.; LINDE, A.; WAHREN, B. - Cytomegalovirus DNA Detection of an Immediate early Protein Gene with Nested Primer Oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, **32**: 127-138, 1991.
- BUFFONE, G.J.; DEMMLER, G.J.; SCHIMBOR, C.M.; GREER, J. - Improved Amplification of Cytomegalovirus DNA from Urine after Purification of DNA with Glass Beads. *Clinical Chemistry*, **37**: 1945-1949, 1991.
- CABALLERO, O.L.; MENEZES, C.L.P.; COSTA, M.C.S.L.; FERNANDES, S.C.; ANACLETO, T.M.; de OLIVEIRA, R.M.; VIOTTI, E.A.; TÁVORA, E.R.F.; VILAÇA, S.S.; SABBAGA, E.; de PAULA, F.J.; TÁVORA, P.F.; VILLA, L.L.; SIMPSON, A.J.G. - Highly Sensitive Single-Step PCR Protocol for Diagnosis and Monitoring of Human Cytomegalovirus infection in Renal Transplant Recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, **35(12)**: 3191-3197, 1997.

- CASSOL, S.A.; POON, M.; PAL, R.; NAYLOR, M.J.; CULVER-JAMES, J.; BOWEN, T.J.; RUSSEL, J.A.; KRAWETZ, S.A.; PON, R.T.; HOAR, D.I. - Primer-Mediated Enzymatic Amplification of Cytomegalovirus (CMV) DNA. *Journal of Clinical Investigation*, **83**: 1109-1115, 1989.
- CHOU, S. – Differentiation of Cytomegalovirus Strains by Restriction Analysis of DNA Sequences Amplified from Clinical Specimens. *Journal of Infectious Diseases*, **162**: 738-742, 1990.
- CHOU, S. – Cytomegalovirus Infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **5**: 427-432, 1992.
- CHOU, S.; DENNISON, K.M. – Analysis of Interstrain Variation in Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequences Encoding Neutralization-Related Epitopes. *Journal of Infectious Diseases*, **163**: 1229-1234, 1991.
- CHOU, S.; MERIGAN, T.C. - Rapid Detection and Quantitation of Human Cytomegalovirus in Urine through DNA Hybridization. *New England Journal of Medicine*, **308**: 921-925, 1983.
- CHOU, S.; MAROUSEK, G.; PARENTI, D.M.; GORDON, S.M.; LaVOY, A. G.; ROSS, J.G.; MINER, R.C.; DREW, L. – Mutation in Tegment III of the DNA Polymerase Gene Conferring Foscarnet Resistance in Cytomegalovirus Isolates from 3 Subjects Receiving Prolonged Antiviral Therapy. *Journal of Infectious Diseases*, **178**: 526-530, 1998.
- CHOU, S. - Antiviral Drug Resistance in Human Cytomegalovirus. *Transplant Infectious Disease*, **1(2)**: 105-114, 1999.
- CLEMENTI, M. – Minireview: Quantitative Molecular Analysis of Virus Expression and Replication. *Journal of Clinical Microbiology*, **38(6)**: 2030-2036, 2000.
- COAQUETTE, A.; BOURGEOIS, A.; DIRAND, C.; VARIN, A.; CHEN, W; HERBEIN, G. – Mixed Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Immunocompromised Patients. *Clinical Infectious Diseases*, **39**: 155-161, 2004.
- COSTA, S.C.B. – Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica*, **25(1)**: 18-28, 1999.

- COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, C.L.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COSTA, F.F. – Detection of Cytomegalovirus Infections by PCR in Renal Transplant Patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**: 953-959, 1999.
- DARLINGTON, J.; SUPER, M.; PATEL, K.; GRUNDY, J.E.; GRIFFITHS, P.D.; EMERY, V.C. – Use of the Polymerase Chain Reaction to Analyse Sequence Variation within a Major Neutralizing Epitope of Glycoprotein B (gp58) in Clinical Isolates of Human Cytomegalovirus. *Journal of General Virology*, **72**: 1985-1989, 1991.
- DEMMLER, G.J.; BUFFONE, G.J.; SCHIMBOR, C.M.; MAY, R.A. - Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using polymerase Chain Reaction DNA Amplification . *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 1177-1184, 1988.
- DREW, W.L. - Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Reviews of Infectious Diseases*, **10 (suppl3)**: 468-476, 1988(a).
- DREW, W.L. - Herpesviridae: Cytomegalovirus. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases (Principles and Practice)*, **vol II**, 247-260, 1988(b).
- EHRNST, A. - The Clinical Relevance of Different Laboratory Tests in CMV Diagnosis. - *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement 100*: 64-71, 1996.
- ERICE, A. – Resistance of Human Cytomegalovirus to Antiviral Drugs. *Clinical Microbiology Reviews*, **12(2)**: 286-297, 1999.
- ERICE, A.; BORRELL, N.; LI, W.; MILLER, W.J.; BALFOUR Jr., H.H. – Ganciclovir Susceptibilities and Analysis of UL97 Region in Cytomegalovirus (CMV) Isolates from Bone Marrow Recipients with CMV Disease after Antiviral Prophylaxis. *Journal of Infectious Diseases*, **178**: 531-534, 1998.
- EVANS, M.J.; EDWARDS-SPRINGS, Y.; MYERS, J.; WENDT, A.; POVINELLI, D.; AMSTERDAM, D.; RITTENHOUSE-DIAKUN, K.; AMSTRONG, D.; MURRAY, B.M.; GREENBERG, S.J.; RIEPENHOFF-TALTY, M. - Polymerase Chain Reaction Assays for the Detection of Cytomegalovirus in Organ and Bone Marrow Transplant Recipients. *Immunological Investigation*, **26 (1&2)**: 209-229, 1997.

FERREIRA-GONZALEZ, A.; FISHER, R.A.; WEYMOUTH, L.A.; LANGLEY, M.R.; WOLFE, L.; WILKINSON, D.S.; GARRETT, C.T. – Clinical Utility of a Quantitative Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplant Patients. *Transplantation*, **68**(7): 991-996, 1999.

FOX, J.D.; BRINK, N.S.; ZUCKERMAN, M.A.; NEILD, P.;GAZZARD, B.G.; TEDDER, R.S.; MILLER, R.F. - Detection of Herpesvirus DNA by Nested Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid of Human Immunodeficiency Virus-infected Persons with Neurologic Disease: A Prospective Evaluation. *Journal of Infectious Diseases*, **172**: 1087-1090, 1995.

FRIES, B.C.; CHOU, S.; BOECKH, M.; TOROK-STORB, B. – Frequency Distribution of Cytomegalovirus Envelope Glycoprotein Genotypes in Bone Marrow Transplant Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **169**: 769-774, 1994.

GERNA, G.; FURIONE, M.; BALDANTI, F.; PERCIVALLE, E.; COMOLI, P.; LOCATELLI, F. – Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA in Bone Marrow Transplant Recipients. *British Journal of Haematology*, **91**: 674-683, 1995.

GERNA, G.; PERCIVALLE, E.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; ZAVATTONI, M.; FURIONE, M.; TORSELLINI, M.; REVELLO, M.G. – Diagnostic Significance and Clinical Impact of Quantitative Assays for Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection/Disease in Immunocompromised Patients. *Microbiologica*, **21**: 293-308, 1998.

GERNA, G.; ZAVATTONI, M.; BALDANTI, F.; SARASINI, A.; CHEZZI, L.; GROSSI, P.; REVELLO, M.G. – Human Cytomegalovirus (HCMV) LeukoDNAemia Correlates more Closely with Clinical Symptoms than Antigenemia and Viremia in Heart and Heart-Lung Transplant Recipients with Primary HCMV Infection. *Transplantation*, **65**(10): 1378-1385, 1998(a).

GILBERT, C.; BOIVIN, G. – Minireview: Human Cytomegalovirus Resistance to Antiviral Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**(3): 873-883, 2005.

GILBERT, C.; HANDFIELD, J.; TOMA, E.; LALONDE, R.; BERGERON, M.G.; BOIVIN, G. - Emergence and Prevalence of Cytomegalovirus UL97 Mutations Associated with Ganciclovir Resistance in AIDS Patients. *AIDS*, **12**: 125-129, 1998.

GILBERT, C.; HANDFIELD, J.; TOMA, E.; LALONDE, R.; BERGERON, M.G.; BOIVIN, G. – Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Blood of AIDS Patients: Lack Association with either the Viral DNA Load in Leukocytes or Presence of Retinitis. *Journal of Medical Virology*, **59**(1): 98-103, 1999.

GOOSSENS, V.J.; BLOK, M.J.; CHRISTIAANS, M.H.L.; SILLEKENS, P.; MIDDELDORP, J.M.; BRUGGEMAN, C.A. – Early Detection of Cytomegalovirus in Renal Transplant Recipients: Comparison of PCR, NASBA, pp65 Antigenemia, and Viral Culture. *Transplantation Proceedings*, **32**(1): 155-158, 2000.

GRIFFITHS, P.D.; WHITLEY, R.J. – Viral Infections in the Immunocompromised Host. *Current Opinion in Infectious Diseases*, **6**: 471-421, 1993.

HEBART, H.; GREIF, M.; KRAUSE, H.; KANZ, L.; JAHN, G.; MÜLLER, C.A.; EINSELE, H. – Interstrain Variation of Immediate Early DNA Sequences and Glycoprotein B Genotypes in Cytomegalovirus Clinical Isolates. *Medical Microbiology and Immunology*, **186**: 135-138, 1997.

HIBBERD, P.L.; SNYDMAN, D.R. – Cytomegalovirus Infection in Organ Transplant Recipients. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9**(4): 863-877, 1995.

HONG, K.M.; NAJJAR, H.; HAWLEY, M.; PRESS, R.D. – Quantitative Real-Time PCR with Automated Sample Preparation for Diagnosis and Monitoring of Cytomegalovirus Infection in Bone Marrow Transplant Patients. **50**(5): 846-856, 2004.

HSIA, K.; SPECTOR, D.H.; LAWRIE, J.; SPECTOR, S.A. - Enzymatic Amplification of Human Cytomegalovirus Sequences by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**: 1802-1809, 1989.

HUANG, E; JOHNSON, R.A. - Human Cytomegalovirus - no Longer just a DNA Virus. *Nature Medicine*, **6**: 863-864, 2000.

HUMAR, A.; KUMAR, D.; GILBERT, C.; BOIVIN, G. – Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Genotypes and Response to Antiviral Therapy, in Solid-Organ-Transplant Recipients with CMV Disease. *Journal of Infectious Diseases*, **188**: 581-584, 2003.

KHAN, G.; KANGRO, G.K.; COATES, P.J.; HEATH, R.B. - Inhibitory Effects of Urine on the Polymerase Chain Reaction for Cytomegalovirus DNA. *Journal of Clinical Pathology*, **44**: 360-365, 1991.

KONTOYIANNIS, D.P.; RUBIN, R.H. – Infection in the Organ Transplant Recipient – An Overview. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 811-822, 1995.

KOTTARIDI, C.; PLOUMIDIS, G.; GRAPSAS, E.; FERETIS, C.; BENAKIS, P.; FILALITHIS, P.; BOUZARELOU, D.; NASIOULAS, G. - Elucidation of cytomegalovirus disease recurrence in an HIV-1-positive patient. *Journal of Gastroenterology*, **38(7)**: 643-646, 2003.

KRAUSE, P.R.; STRAUS, S.E. – Herpesvirus Vaccines. *Infectious Disease Clinics of North America*, **13(1)**: 61-81, 1999.

KWOK, S.; HIGUSHI, R. - Avoiding False Positives with PCR. *Nature*, **339**: 237-238, 1989.

LANDOLFO, S.; GARIGLIO, M.; GRIBAUDO, G.; LEMBO, D. – The Human Cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics*, **98**: 269-297, 2003.

LASRY, S.; DÉNY, P.; ASSELO, C.; RAUZY, M.; BOUCHER, J.; GUYOT, C.; LEROUX, M.C.; LIVARTOWSKI, A.; REINERT, P.; NICOLAS, J.C. – Interstrain Variations in the Cytomegalovirus (CMV) Glycoprotein B Gene Sequence among CMV-Infected Children Attending Six Day Care Centers. *Journal of Infectious Diseases*, **174**: 606-609, 1996.

LEGENDRE, C.; THERVET, E. – Cytomegalovirus Prophylaxis in Solid Organ Transplant Recipients: The Issues. *Transplantation Proceedings*, **32(2)**: 377-378, 2000.

LEHNER, R.; STAMMINGER, T.; MACH, M. – Comparative Sequence Analysis of Human Cytomegalovirus Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**: 2494-2502, 1991.

LIPSON, S.M.; MATCH, M.E.; TORO, A.I.; KAPLAN, M.H.; SHEPP, D.H. – Application of a Standardized Cytomegalovirus Antigenemia Assay in the Management of Patients with AIDS. *Diagnostic Microbiology in Infectious Diseases*, **32**: 75-79, 1998.

LIMAYE, A.P.; BOWDEN, R.A.; MYERSON, D., BOECKH, M. - Cytomegalovirus disease occurring before engraftment in marrow transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases*, **24(5)**:830-835, 1997.

LJUNGMAN, P. – Cytomegalovirus Infections in Transplant Patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement* **100**: 59-63, 1996.

LURAIN, N.S.; AMMONS, H.C.; KAPPELL, K.S.; YELDANDI, V.V.; GARRITY, E.R.; O'KEEFE, J.P. - Molecular Analysis of Human Cytomegalovirus Strains from Two Lung Transplant Recipients with the Same Donor. *Transplantation*, **62**: 497-502, 1996.

LURAIN, N.S.; BHORADE, S.M.; PURSELL, K.J.; AVERY, R.K.; YELDANDI, V.V.; ISADA, C.M.; ROBERT, E.S.; KOHN, D.J.; ARENS, M.Q.; GARRITY, E.R.; TAEGER, A.J.; MULLEN, M.G.; TODD, K.M.; BREMER, J.W.; YEN-LIEBERMAN, B. - Analysis and Characterization of Antiviral Drug-Resistant Cytomegalovirus Isolates from Solid Organ Transplant Recipients. *Journal of Infection Diseases*, **186(6)**: 760-768, 2002.

MACHIDA, U.; KAMI, M.; FUKUI, T.; KAZUYAMA, Y.; KINOSHITA, M.; TANAKA, Y.; KANDA, Y.; OGAWA, S.; HONDA, H.; CHIBA, S.; MITANI, K.; MUTO, Y.; OSUMI, K.; KIMURA, S.; HIRAI, H. - Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, **38(7)**:2536-2542, 2000.

MARTIN-DAVILA, P.; FORTUN, J.; GUTIERREZ, C.; MARTI-BELDA, P.; CANDELAS, A.; HONRUBIA, A.; BARCENA, R.; MARTINEZ, A.; PUENTE, A.; DE VICENTE, E.; MORENO, S. - Analysis of a quantitative PCR assay for CMV infection in liver transplant recipients: an intent to find the optimal cut-off value. *Journal of Clinical Virology*, **33(2)**:138-144, 2005.

MAYA, T.C.; AZULAY, D.R. – Infecção pelo Citomegalovírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. – *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2000. Cap. 8, p. 135-156.

McKEATING, J.A.; STAGNO, S.; STIRK, P.R.; GRIFFITHS, P.D. - Detection of Cytomegalovirus in Urine Samples by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Journal of Medical Virology*, **16**: 367-373, 1985.

MENDEZ, J.; ESPY, M.; SMITH, T.F.; WILSON, J.; WIESNER, R.; PAYA, C.V. – Clinical Significance of Viral Load in the Diagnosis of Cytomegalovirus Disease after Liver Transplantation. *Transplantation*, **65(11)**: 1477-1481, 1998.

MEYER-KÖNIG, U.; VOGELBERG, C.; BONGARTS, A.; KAMPA, D.; DELBRÜCK, R.; WOLFF-VORBECK, G.; KIRSTE, G.; HABERLAND, M.; HUFERT, F.T.; von LAER, D. – Glycoprotein B Genotype Correlates with Cell Tropism *In Vivo* of Human Cytomegalovirus Infection. *Journal of Medical Virology*, **55**: 75-81, 1998.

MEYER-KÖNIG, U.; HABERLAND, M.; von LAER, D.; HALLER, O.; HUFERT, F.T. – Intragenic Variability of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B in Clinical Strains. *Journal of Infection Diseases*, **177**: 1162-1169, 1998(2).

MOCARSKI, E.S.Jr.; ABENES, G.B.; MANNING, W.C.; SAMBUCETTI, L.C.; CHERRINGTON, J.M.- Molecular Genetic Analysis of Cytomegalovirus Gene Regulation in Growth, Persistence and Latency. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 47-73, 1990.

MONTE, P.D.; LAZZAROTTO, T.; RIPALTI, A; LANDINI, M.P. - Human cytomegalovirus infection: a complex diagnostic problem in which molecular biology has induced a rapid evolution. *Intervirology*, **39(3)**:193-203, 1996;.

MURRAY, B.M. – Management of Cytomegalovirus Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *Immunological Investigations*, **26**: 243-255, 1997.

MUSTAFA, M.M. - Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host. *The Pediatric Infectious Diseases Journal*, **13**: 249-259, 1994.

NAJIOULLAH, F.; THOUVENOT, D.; LINA, B. – Development of a Real-Time PCR Procedure Including an Internal Control for the Measurement of HCMV Viral Load. *Journal of Virological Methods*, **92(1)**: 55-64, 2001.

NAVARRO, D.; LENNETTE, E.; TUGIZOV, S.; PEREIRA, L. – Humoral Immune Response to Functional Regions of Human Cytomegalovirus Glycoprotein B. *Journal of Medical Virology*, **52**: 451-459, 1997.

OLIVE, D.M.; AL-MUFTI, S.; SIMSEK, M.; FAYEZ, H.; AL NAKIB, W. - Direct Detection of Human Cytomegalovirus in Urine Specimens from Renal Transplant Patients Following Polymerase Chain Reaction Amplification. *Journal of Medical Virology*, **29**: 232-237, 1989.

PALACIO, A.; DURAN-VILA, N. – Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis as a Tool for Viroid Characterisation. *Journal of Virological Methods*, **77**: 27-36, 1999.

PANNUTI, C.S. - Infecção por Citomegalovírus. *Revista de Ensaios Pediátricos* (São Paulo), **6**:144-153, 1984.

PATEL, R.; PAYA, C.V. – Infections in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews*, **10**: 86-124, 1997.

PLACHTER, B.; SINZGER, C.; JAHN, G. – Cell Types Involved in Replication and Distribution of Human Cytomegalovirus. *Advances in Virus Research*, **46**: 195-261, 1996.

PORTER-JORDAN, K.; ROSEMBERG, E.I.; KEISER, J.F.; GROSS, J.D.; ROSS, A.M.; NASSIM, S.; GARRET, C.T. - Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Cytomegalovirus Overcomes False Positive Caused by Contamination with Fragmented DNA. *Journal of Medical Virology*, **30**: 85-91, 1990.

PRIX, L.; HAMPRECHT, K.; HOLZHUTER, B.; HANDGRETINGER, R.; KLINGEBIEL, T.; JAHN, G. - Comprehensive Restriction Analysis of the UL97 Region Allows Early Detection of Ganciclovir-Resistant Human Cytomegalovirus in an Immunocompromised Child. *Journal of Infectious Diseases*, **180** (2): 491-495, 1999.

RASMUSSEN, L. – Immune Response to Human Cytomegalovirus Infection. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 221-254, 1990.

RASMUSSEN, L.; MORRIS, S.; ZIPETO, D.; FESSEL, J.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; MERIGAN, T.C. – Quantitation of Human Cytomegalovirus DNA from Peripheral Blood Cells of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Could Predict Cytomegalovirus Retinitis. *Journal of Infectious Diseases*, **171**: 177-182, 1995.

RASMUSSEN, L.; HONG, C.; ZIPETO, D.; MORRIS, S.; SHERMAN, D.; CHOU, S.; MINER, R.; DREW, W.L.; WOLITZ, R.; DOWLING, A.; WARFORD, A.; MERIGAN, T.C. – Cytomegalovirus gB Genotype Distribution Differs in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients and Immunocompromised Allograft Recipients. *Journal of Infectious Diseases*, **175**: 179-184, 1997.

RETIÈRE, C.; IMBERT, B.M.; DAVID, G.; COURCOUX, P.; HALLET, M.M. – A Polymorphism in the Major Immediate-Early Gene Delineates Groups Among Cytomegalovirus Clinical Isolates. *Virus Research*, **57**: 43-51, 1998.

ROSEN, H.R.; CORLESS, C.L.; RABKIN, J.M.; CHOU, S. – Association of Cytomegalovirus Genotype with Graft Rejection after Liver Transplantation. *Transplantation*, **66**: 1627-1631, 1998.

RUBIN, R.H. – Introduction to the Symposium. *Review of Infectious Diseases*, **12(Suppl.)**: 691-692, 1990.

RÜGER, R.; BORNKAMM, G.W.; FLECKENSTEIN, B. – Human Cytomegalovirus DNA Sequences with Homologies to the Cellular Genome. *Journal of General Virology*, **65**: 1351-1364, 1984.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. - Enzymatic Amplification of Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analyses for Diagnosis of Sick Cell Anemia. *Science*, **230**: 1350-1354, 1985.

SCHAFER, P.; TENSCHERT, W.; GUTENSOHN, K.; LAUFS, R. - Minimal effect of delayed sample processing on results of quantitative PCR for cytomegalovirus DNA in leukocytes compared to results of an antigenemia assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **35(3)**:741-744, 1997.

SHEN, C., CHANG, B.; CHANG, S.; YANG, S.; TSENG, S.; CHEN, C.; WU, C. – Molecular Epidemiology of Cytomegalovirus Infection in Kindergarten Children. *Journal of Medical Virology*, **48**: 33-37, 1996.

SHEPP, D.H.; MATCH, M.E.; ASHRAF, A.B.; LIPSON, S.M.; MILLAN, C.; PERGOLIZZI, R.G. – Cytomegalovirus Glycoprotein B Groups Associated with Retinitis in AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, **174**: 184-187, 1996.

- SHEPP, D.H.; MATCH, M.E.; LIPSON, S.M.; PERGOLIZZI, R.G. – A Fifth Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype. *Research in Virology*, **149**: 109-114, 1998.
- SHIBATA, D.; MARTIN, W.J.; APPLEMAN, M.D.; CAUSEY, D.M.; LEEDOM, J.M.; ARNHEIM, N. - Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Infectious Diseases*, **158**: 1185-1192, 1988.
- SHIBATA, D.; TERASHIMA, M.; KIMURA, H.; KUSUSHIMA, K.; YOSHIDA, J.; HIRIBE, K.; MORISHIMA, T. – Quantitation of Cytomegalovirus DNA in Lung Tissue of Bone Marrow Transplant Recipients. *Human Pathology*, **23**: 911-915, 1992.
- SIA, I.G.; PATEL, R. - New strategies for prevention and therapy of cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clinical Microbiological Reviews*, **13(1)**:83-121, 2000.
- SIA, I.G.; WILSON, J.A.; GROETTUM, C.M.; ESPY, M.J.; SMITH, T.F.; PAYA, C.V. – Cytomegalovirus (CMV) DNA Load Predicts Relapsing CMV Infection after Solid Organ Transplantation. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 717-720, 2000.
- SILVA, A.G. – Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA Jr., A.C. – *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 2000. Cap. 8, p. 135-156.
- SOWMYA, P.; MADHAVAN, H.N.; THERESE, K.L. – Failure to Genotype Human Cytomegalovirus by PCR-RFLP Method Due to Sequence Variation Within the Primer Binding Site. *Journal of Virological Methods*, 2006 (*In Press*)
- SPECTOR, D.H.; KLUCHER, K.M.; RABERT, D.K.; WRIGHT, D.A. – Human Cytomegalovirus Early Gene Expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **154**: 21-45, 1990.
- STINSKI, M.F. - Cytomegalovirus and Its Replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. - *Virology*, 2ª ed., New York, Raven Press Ltda, p. 1959-1980, 1990.
- TONG, C.Y.W. – Diagnosis of Cytomegalovirus Infection and Disease. *Journal of Medical Microbiology*, **46**: 717-719, 1997.

TRINCADO, D.E.; SCOTT, G.M.; WHITE, P.A.; HUNT, C.; RASMUSSEN, L.; RAWLINSON, W.D. – Human Cytomegalovirus Strains Associated with Congenital and Perinatal Infections. *Journal of Medical Virology*, **61**: 481-487, 2000.

TOROK-STORB, B; BOECKH, M.; HOY, C.; LEISENRING, W.; MYERSON, D.; GOOLEY, T. – Association of Specific Cytomegalovirus Genotypes with Death from Myelosuppression after Marrow Transplantation. *Blood*, **90(5)**: 2097-2102, 1997.

VOGELBERG, C.; MEYER-KÖNIG, U.; HUFERT, F.T.; KIRSTE, G.; von LAER, D. – Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Renal Transplant Recipients. *Journal of Medical Virology*, **50**: 31-34, 1996.

WADA, K.; MIZUNO, S.; KATO, K.; KAMIYA, T.; OZAWA, K. – Cytomegalovirus Glycoprotein B Sequence Variation among Japanese Bone Marrow Transplant Recipients. *Intervirology*, **40**: 215-219, 1997.

WALTER, E.A.; BOWDEN, R.A. – Infection in the Bone Marrow Transplant Recipient. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 823-847, 1995.

WILDEMANN, B.; HASS, J.; LYNEN, N.; STINGELE, K.; STORCH-HAGENLOCHER, B. – Diagnosis of Cytomegalovirus Encephalitis in Patients with AIDS by Quantitation of Cytomegalovirus Genomes in Cells of Cerebrospinal Fluid. *Neurology*, **50**: 693-697, 1998.

WINGART, B.Z.; BRYTTING, M.; LINDE, A.; WAHREN, B.; GRILLNER, L. – Sequence Variation within Three Important Cytomegalovirus Gene Regions in Isolates from Four Different Patient Populations. *Journal of Clinical Microbiology*, **36(12)**: 3662-3669, 1998.

XU, W; SUNDQVIST, V.A.; BRYTTING, M.; LINDE, A. - Diagnosis of Cytomegalovirus Infections Using Polymerase Chain Reaction, Virus Isolation and Serology. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, **25**: 311-316, 1993.

YOSHIDA, A.; HITOMI, S.; FUKUI, T.; ENDO, H.; MORISAWA, Y.; KAZUYAMA, Y.; OSUMI, K.; OKA, S.; KIMURA, S. – Diagnosis and Monitoring of Human Cytomegalovirus Diseases in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection by Use of a Real-Time PCR Assay. *Clinical Infectious Diseases*, **33**: 1756-1761, 2001.

YUN, Z.; LEWENSOHN-FUCHS, I.; LJUNGMAN, P.; RINGHOLM, L.; JONSSON, J.; ALBERT, J. – A Real-time Taq Man PCR for Routine Quantitation of Cytomegalovirus DNA in Crude Leukocyte Lysates from Stem Cell Transplant Patients. *Journal of Virological Methods*, **110**: 73-79, 2003.

ZAIA, J.A.; FORMAN, S.J. – Cytomegalovirus Infection in Bone Marrow Transplant Recipient. *Infectious Disease Clinics of North America*, **9(4)**: 879-900, 1995.

ZAIA, J.A.; GALLEZ-HAWKINS, G.M.; TEGTMEIER, B. R.; ter VEER, A.; LI, X.; NILAND, J.N.; FORMAN, S.J. – Late Cytomegalovirus Disease in Marrow Transplantation Is Predicted by Virus Load in Plasma. *Journal of Infectious Diseases*, **176**: 782-785, 1997.

ZHOU, L.; HARDER, T.C.; ULLMANN, U.; RAUTENBERG, P. - Rapid Detection by Reverse Hibridization of Mutants in the UL97 Gene of Human Cytomegalovirus Conferring Resistance to Ganciclovir. *Journal of Clinical Virology*, **13(1-2)**: 53-59, 1999.

9- ANEXO

ANEXO 1- Seguimento dos Pacientes Incluídos no Estudo;

AMOSTRA	RT-PCR (cópias/ml)	nPCR sangue	nPCR soro	AMOSTRA	RT-PCR (cópias/ml)	nPCR sangue	nPCR soro
01LMC -001	0	0	0	11LNH 042	38,4	POS	POS
01LMC 007	0	NR	0	11LNH 057	0	0	0
01LMC 014	0	NR	0	11LNH 079	0	0	0
01LMC 020	0	NR	0	11LNH 120	0	0	0
01LMC 032	0	POS	0	11LNH 128	NR	0	0
01LMC 046	0	POS	0	11LNH 146	NR	0	0
01LMC 061	0,1305	POS	0	12LNH 026	NR	POS	NR
01LMC 075	0,885	POS	0	12LNH 041	NR	POS	NR
01LMC 089	0	0	0	12LNH 069	NR	POS	NR
01LMC 104	0,3555	0	0	13MM -003	0	POS	0
01LMC 119	NR	POS	0	13MM 007	4,165	NR	0
01LMC 137	NR	0	0	13MM 021	1,055	POS	0
01LMC 154	NR	0	0	13MM 035	0	POS	0
04LMC -001	0	0	0	13MM 050	0	0	0
04LMC 007	0	NR	0	13MM 067	0	0	0
04LMC 014	0	0	0	13MM 078	0	0	0
04LMC 029	0	POS	0	13MM 093	0	0	0
04LMC 047	2,485	POS	0	13MM 113	NR	0	0
04LMC 062	104	POS	POS	13MM 121	NR	0	0
04LMC 077	0,442	POS	POS	13MM 136	NR	0	0
04LMC 089	1,12	POS	0	13MM 163	NR	0	0
04LMC 105	29	POS	0	14AA 000	NR	POS	0
04LMC 120	NR	0	0	14AA 006	NR	NR	NR
04LMC 140	NR	0	0	14AA 013	NR	NR	0
04LMC 154	NR	0	0	14AA 020	NR	0	0
05MM 007	NR	NR	POS	14AA 028	NR	0	0
05MM 014	NR	0	0	14AA 041	NR	0	0
05MM 029	NR	0	0	14AA 056	NR	0	0
05MM 044	NR	POS	0	14AA 064	NR	0	0
05MM 064	NR	0	NR	14AA 085	NR	0	0
05MM 079	NR	0	0	14AA 127	NR	0	0
05MM 093	NR	0	0	14AA 154	NR	NR	0
05MM 106	NR	0	0	15LMA -001	0	0	0
05MM 123	NR	0	0	15LMA 007	0	NR	0
06LMC 000	0	0	0	15LMA 014	0	NR	0
06LMC 007	0	NR	0	15LMA 021	0	0	0
06LMC 014	0	NR	0	15LMA 048	0	POS	0
06LMC 021	0	0	0	15LMA 069	12,75	POS	0
06LMC 036	0	0	0	15LMA 104	0	0	0
06LMC 042	0	POS	0	15LMA 131	NR	0	0
06LMC 063	0	POS	0	15LMA 146	NR	0	0
06LMC 069	0	POS	0	17LMC -001	0	0	0
06LMC 083	8,5	0	0	17LMC 008	0	NR	0
06LMC 111	0	0	0	17LMC 013	0	NR	0
06LMC 130	NR	0	0	17LMC 020	0,1385	0	0
06LMC 139	NR	0	0	17LMC 033	0	0	0
06LMC 156	NR	0	0	17LMC048	0	POS	0
08LNH-003	NR	POS	NR	17LMC 056	5,35	POS	0
08LNH 007	NR	NR	0	17LMC 071	NR	0	NR
08LNH 014	0	0	0	17LMC 081	0	0	0
08LNH 035	0	0	0	17LMC 098	0	0	0
08LNH 052	0	0	0	17LMC 126	NR	0	0
08LNH 067	0	0	0	17LMC 141	NR	0	0
08LNH 080	0	0	0	17LMC 159	NR	0	0
08LNH 101	0	0	0	18LNH 000	NR	0	0
08LNH 116	NR	0	0	18LNH 008	NR	NR	0
08LNH 141	NR	0	0	18LNH 043	NR	0	0
08LNH 156	NR	0	0	18LNH 062	NR	POS	0
10MM 000	0	0	0	18LNH 078	NR	0	0
10MM 009	0,7	POS	0	18LNH 094	NR	0	0
10MM 029	0	0	POS	18LNH 121	NR	0	0
10MM 044	0	POS	0	18LNH 142	NR	0	0
10MM 059	0	0	0	18LNH 157	NR	0	0
10MM 074	0	0	0	18LNH 168	NR	0	0
10MM 091	0	0	0	19LMC 000	NR	0	0
10MM 106	0	0	0	19LMC 006	NR	NR	0
10MM 123	NR	0	0	19LMC 013	NR	NR	0
10MM 140	NR	0	NR	19LMC 025	NR	0	0
10MM 155	NR	0	0	19LMC 040	NR	POS	0
11LNH 008	0	NR	POS	19LMC 057	NR	POS	NR
11LNH 015	0	NR	0	19LMC 068	NR	POS	NR
11LNH 023	0	NR	0	20LMA -001	0	0	POS
11LNH 029	1,225	POS	0	20LMA 006	0	POS	0

AMOSTRA	RT-PCR (cópias/ml)	nPCR sangue	nPCR soro
20LMA 013	0	0	0
20LMA 026	1	0	0
20LMA 041	0	0	0
20LMA 061	0	0	0
20LMA 084	0	0	0
20LMA 099	0	0	0
20LMA 111	NR	0	NR
20LMA 118	NR	0	0
20LMA 152	NR	0	0
21LNH 000	NR	0	0
21LNH 006	NR	NR	0
21LNH 013	NR	NR	NR
21LNH 018	0	POS	0
21LNH 025	0	0	0
21LNH 041	8,4	POS	0
21LNH 060	0	0	0
21LNH 076	0	0	0
21LNH 095	0	0	0
21LNH 124	NR	0	0
21LNH 144	NR	0	0
21LNH 152	NR	0	0
23LNH -001	0	0	0
23LNH 006	0	NR	0
23LNH 012	0	0	0
23LNH 055	0	0	0
23LNH 069	0	0	0
23LNH 083	0	0	0
23LNH 103	0	0	0
23LNH 118	NR	0	0
23LNH 136	NR	0	0
24LH 000	NR	0	0
24LH 008	NR	NR	0
24LH 019	NR	0	0
24LH 046	NR	POS	0
24LH 064	NR	0	0
24LH 081	NR	0	0
24LH 104	NR	0	0
25LMA 028	NR	POS	NR
25LMA 040	NR	POS	NR
25LMA 057	NR	POS	NR
25LMA 071	NR	POS	NR
26LMA-003	NR	0	NR
26LMA 017	NR	0	NR
26LMA 037	NR	0	NR
26LMA 058	NR	0	NR
26LMA 070	NR	0	NR
27LMC-001	NR	0	NR
27LMC 014	NR	POS	NR
27LMC 049	NR	POS	NR
27LMC 067	NR	POS	NR
27LMC 098	NR	NR	NR
22LH 028	NR	POS	NR